

# ACTA

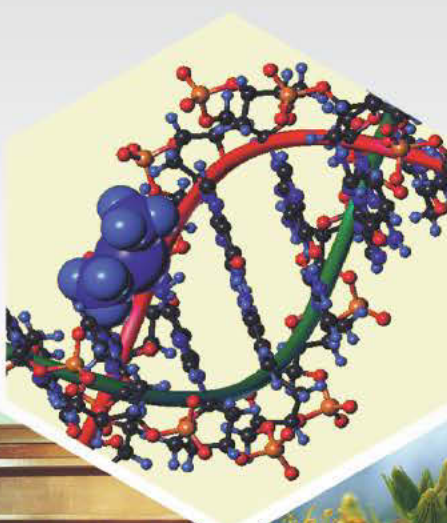
## PHARMACEUTICA HUNGARICA

# 1.

## 2015

APHGAO 85, (043) 1–40. (2015)

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata





# ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.

Tel.: 217-0891;

E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,

Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,

1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.

Tel.: 217-0927;

E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica

1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,

1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.

Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Budai Kinga Anna, Mirzahosseini Arash, Noszál Béla, Tóth Gergő: Az elhízás gyógyszeres kezelése . . .</i>	3
<i>Horváth Tamás, Ambrus Rita, Szabóné Révész Piroska: Nazális gyógyszerformák permeabilitási vizsgálata Side-Bi-Side™ horizontális cella alkalmazásával. . . . .</i>	19
<i>Riethmüller Esztera, Tóth Gergő, Alberti Ágnes, Végh Krisztina, Béni Szabolcs, Balogh György Tibor, Kéry Ágnes: Diarilheptanoidok előfordulása a mogyoró nemzetség Kárpát-medencében honos fajaiban . . . .</i>	29

## CONTENTS

<i>Budai, K. A., Mirzahosseini A., Noszál, B., Tóth, G.:</i> The pharmacotherapy of obesity . . . . .	3
<i>Horváth, T., Ambrus, R., Szabó-Révész, P.:</i> Investigation of permeability of intranasal formulations using Side-Bi-Side™ horizontal diffusion cell . . . . .	19
<i>Riethmüller, E., Tóth, G., Alberti, Á., Végh, K., Béni, Sz., Balogh, Gy.T., Kéry, Á.:</i> Occurrence of diarylheptanoids in <i>Corylus</i> species native to Hungary . . . . .	29

Acta Pharmaceutica Hungarica: [www.mgyt.hu](http://www.mgyt.hu)

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata  
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: [szerkesztoseg@mgyt.hu](mailto:szerkesztoseg@mgyt.hu)

**Felelős kiadó: Prof. Dr. Szőkő Éva**

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással  
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530

Adószám: 19000754–2–42

Előfizetési díj egész évre: 6000 Ft + 300 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 700 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: Print Invest Magyarország-H Zrt., 1053 Budapest, Papnövelde út 8. II. em. 26.

Felelős vezető: Ványik László ügyvezető igazgató

## Az elhízás gyógyszeres kezelése

BUDAI KINGA ANNA, MIRZAHOSSEINI ARASH, NOSZÁL BÉLA, TÓTH GERGŐ\*

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia Kábító- és Doppingszer-tudományi Társult Kutatócsoport

1092 Budapest, Hőgyes Endre utca 9.

\*Levelezési cím: gergo.toth85@gmail.com, toth.gergo@pharma.semmelweis-univ.hu

### Summary

BUDAI, K. A., MIRZAHOSSEINI A., NOSZÁL, B., TÓTH, G.: *The pharmacotherapy of obesity*

Obesity is considered the most concerning and blatantly visible – yet most neglected – public health problem by the WHO. The steadily increasing number of overweight and obese people has reached 2.3 billion and 700 million worldwide, respectively. Obesity is a complex condition, one that presents serious health risks with respect to type 2 diabetes, ischemic heart disease, and hypertension, therefore controlling the global obesity epidemic decreases not only health problems, but also expenditure. The underlying cause of obesity is a metabolic disorder of genetic, central nervous system or endocrine etiology that manifests in increased nutritional intake and/or decreased physical activity ultimately leading to excessive lipogenesis. The natural treatment of obesity, that is often advised, is comprised of healthy lifestyle choices, namely low-calorie diet and exercise. However, the pharmaceutical treatment of obesity is just as important; having a better compliance rate, anti-obesity drugs also improve quality of life and patient-care outcome concerning accompanying diseases. In most countries only one drug is currently available against obesity: orlistat, which is a specific and irreversible lipase inhibitor. One of the reasons for the scarce number of anti-obesity drugs is the complex pathomechanism involved in obesity. Interference with the intricate biochemical processes that govern alimentation may lead to widespread adverse effects. The advances of the field however, have prompted novel drug leads. In the past few years FDA has approved new drugs for the treatment of obesity, recently liraglutide in 2014. The approval of drug combinations, such as phentermine/topiramate and bupropion/naltrexone are also noteworthy, the components of which have been previously approved, but not necessarily for obesity as main indication. Furthermore, there are many anti-obesity drug candidates currently in clinical phase trials, with promisingly modest adverse effect profiles; hence the expansion of the anti-obesity agents in the near future can be foreseen. The present work summarizes the central and peripheral regulatory pathways of energy consumption, nutrition, and appetite. The possible drug targets, the currently available and novel anti-obesity agents, and the new trends in obesity research are also discussed.

Keywords: obesity, liraglutide, Contrave, Qsymia, cetilistat

### Összefoglaló

A WHO az elhízást korunk legnagyobb egészségügyi problémájának tekinti. Az elhízottak és túlsúlyosak száma világszerte folyamatosan nő, ma 2,3 milliárd túlsúlyos és 700 millió elhízott embertársunk van. Az elhízás számos betegség kialakulásában is szerepet játszik - 2. típusú cukorbetegség, isémiás szívbetege, hipertónia - így megszüntetése sokoldalúan csökkenti az egészségkárosodásokat és a gyógyászati kiadásokat. Az elhízás hátterében olyan genetikai, központi idegrendszeri vagy endokrin eredetű anyagcsere zavarok állnak, melyek a táplálékfelvétel növekedésében és/vagy az energialeadás csökkenésében nyilvánulnak meg, végül túlzott zsírraktározáshoz vezetnek. Az elhízás kezelésének természetes, ajánlott módja a diéta, az energiabevitel csökkentése és a fizikai aktivitás növelése. Nem kevésbé fontos azonban a gyógyszeres beavatkozás, mely növeli a beteg együttműködést, kedvező hatást gyakorol az elhízás kísérőbetegségeire és javítja az életminőséget. Ma a világ legtöbb országában, Magyarországon is, mindössze egy vegyület áll rendelkezésre az elhízás kezelésében, ez az orlistat, amely a gasztrointesztinális lipázok specifikus és tartós gátlója. A hatóanyagok alacsony számának egyik oka az elhízás patomechanizmusának bonyolultsága. A testsúly szabályozásába való beavatkozás számos szervet és biokémiai folyamatot érinthet, amely mellékhatásokat idézhet elő. Ebben a témában bővülő tudományos ismeretek azonban számos új gyógyszerjelölt molekulához vezettek. Az utóbbi években az FDA több gyógyszer forgalmazását engedélyezte elhízás kezelésében, legutóbb 2014 decemberében a liraglutidot. Kiemelendők az új, törzskönyvezett hatóanyag kombinációk (fentermin/topiramát, bupropion/naltrexon), amelyekre jellemző, hogy a kombinációban található komponensek már korábban törzskönyvezésre kerültek monoterápiában, azonban a kombináció legalább egyik komponense nem elhízás ellen lett kifejlesztve. Klinikai fázis vizsgálatokban is számos új hatóanyagról bizonyították, hogy jelentős mellékhatásoktól mentesen képesek a testsúly csökkentésére, vagyis további új elhízás elleni gyógyszer megjelenése várható. Jelen közleményünkben összefoglaljuk az energiamérleg, a táplálékfelvétel és az étvágy központi idegrendszeri és perifériás szabályozásának főbb pontjait. Bemutatjuk a gyógyszerek lehetséges támadáspontjait, összefoglaljuk az elhízás kezelésére elérhető, a fejlesztés alatt álló szereket illetve a kutatás új irányvonalait.

Kulcsszavak: elhízás, liraglutid, gyógyszeres kezelés, orlistat, étvágy szabályozás



## Bevezetés

Az elhízás egy olyan kórállapot, melyben a túlzott zsírraktározás oly mértékű, hogy az káros az egészségre. Az elhízás napjaink egyik legnagyobb egészségügyi és gazdasági kihívása, ami főleg a fejlett, jóléti társadalmak metabolikus betegsége. A XXI. század embere számára obezitogén környezetet jelent a túlzott fogyasztásra ösztönző élelmiszeripar, az ülőmunkahelyek, a kis erőfeszítést igénylő szabadidős tevékenységek és a motorizáció. A WHO az elhízást az egész világra kiterjedő járványnak nyilvánította, ugyanis 2010-es felmérése szerint világszerte 2,3 milliárd felnőtt volt túlsúlyos és 700 millió elhízott. Az elhízás tehető felelőssé az összhalálozás 10-30%-áért, ami elsősorban a szövődményeknek és kísérőbetegségeknek - hipertónia, metabolikus szindróma, cukorbetegség – köszönhető. A súlyos egészségügyi következmények, továbbá a gazdasági okok indokolják, hogy az elhízást ne kozmetikai problémának tekintsük, hanem kórképnek, és mindent megtegyünk a prevencióért és a megfelelő intervenciók stratégiák kidolgozásáért.

Az elhízás mértékét a testtömeg indexszel (TTI, vagy angolul BMI) jellemezhetjük, ami a kilogrammban mért testtömeg és a méterben számolt magasság négyzetének hányadosa ( $\text{kg/m}^2$ ). A BMI kategóriák és kockázati szerepük a felnőtt lakosságra vonatkozóan az **I. táblázatban** láthatók.

A táblázatból látható, hogy 25-ös BMI felett túlsúlyról, míg 30-as BMI felett elhízásról beszélünk, amely több fokozatra osztható.

Nyilvánvaló, hogy az elhízást és a velejáró kórkepeket kezelni kell. Az elhízás kialakulásának okai összetettek. A kórképet tartósan megemelt energiabevitel tartja fenn, hosszútávon felborítva az energiaegyensúlyt. A testsúlynövekedés rendszerint a „modern” életstílusra vezethető visz-

sza, míg a morbid obezitás nagyobb valószínűséggel fejlődik ki ritka génmutációk manifesztálódása nyomán. Az elhízás kezelése többlépcsős folyamat. Ennek során meg kell határoznunk egy reális célsúlyt, csökkenteni kell az elhízást kísérő betegségek kialakulásának kockázatát, illetve ki kell dolgozni egy súlymegtartó programot is. Az elhízás kezelésének kezdeti lépése az életmód változtatása, vagyis a diéta és a fizikai aktivitás növelése. Az életmódváltás adjuváns terápiájaként gyógyszeres kezelést csak azokban az esetekben alkalmaznak, ha a  $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ , vagy a  $\text{BMI} \geq 27 \text{ kg/m}^2$  és kísérőbetegségek lépnek fel. Három hónapos gyógyszeres kezelés után értékelni kell annak eredményességét. Sikeres (> 5%-os testtömegcsökkenés) terápia esetén folytatni kell a kezelést, ennek hiányában azt abba kell hagyni, és ha lehetőség van, új gyógyszert kell kipróbálni. A reális cél a hat hónap alatti 5-10%-os testtömegcsökkenés, amely már kedvező hatást gyakorol az egészségi állapotra. Sebészeti beavatkozást csak eredménytelen fogyókúra esetén alkalmaznak azokban az esetekben, amikor a  $\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$ , vagy a  $\text{BMI} \geq 35 \text{ kg/m}^2$  és társbetegségek kísérik. Ez élet-hosszig tartó ellenőrzést igényel [1-6].

A szervezet testsúlyszabályozása nagyon összetett, amelynek minden folyamatát még nem értjük teljesen, ezért az elérhető elhízás elleni gyógyszerek száma egyelőre csekély. A forgalomba kerülő új szerek jelentős bevétellel kecsegtetnek, emiatt nagy változás zajlik jelenleg a gyógyszerkutatás területén. Az utóbbi években az FDA több készítményt is engedélyezett elhízás kezelésére, amely jelzi, hogy a közeljövőben az elhízás elleni szerek száma megtöbbszörözödhet. Jelen közleményünkben összefoglaljuk az energiamérleg, táplálékfelvétel és az étvágy központi idegrendszeri és perifériás szabályozását, ismertetjük az elhízás kezelésében alkalmazható gyógyszerek támadáspontjait,

I. táblázat

BMI kategóriák és veszélyei az egészségi állapotra

Kategóriák	BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	kockázati szerepe
Alultápláltság	<18,5	fokozott
Súlyos alultápláltság	<16,0	igen magas
Mérsékelt alultápláltság	16,0-16,99	mérsékeltlen magas
Enyhe alultápláltság	17,0-18,49	enyhén magas
Normál	18,5-24,9	a legkisebb
Túlsúly (preobezitás)	25,0-29,9	emelkedett
Elhízás	$\geq 30,0$	fokozott
Elhízás I. fokozat (enyhe)	30,0-34,9	magas
Elhízás II. fokozat (mérsékelt)	35,0-39,9	kifejezetten magas
Elhízás III. fokozat (súlyos, extrém)	$\geq 40,0$	extrém magas

az elérhető gyógyszereket, illetve a jövőbeni kilátásokat.

### Az energiamérleg, a táplálékfelvétel és az étvágy szabályozása

A táplálékfelvételt szabályozó mechanizmusok arra hivatottak, hogy biztosítsák az energiamérleg egyensúlyát (homeosztatikus szabályozás). Azonban a táplálkozásnak van egy örömszerző funkciója is, amely nagyobb energiabevitelre ösztökél, és felülírja a homeosztatikus szabályozást. Az erőltetett energiabeviteli többlet („forced feeding”) következtében nő a zsírszövet tömege, vagyis elhízáshoz vezet. A rendkívül bonyolult módon szabályozott táplálkozás központja a hipotalamuszban helyezkedik el. A beérkező információk alapján elindítja, elutasítja vagy felfüggeszti az evési folyamatot. Ezen kívül összehangolja az energiárafordítást az energiabevittel az autonóm idegrendszeren és a neuroendokrin rendszeren keresztül. A táplálkozás szabályozásában számos neurotransmitter és perifériás molekula vesz részt.

#### *A táplálékfelvétel központi szabályozása*

A hipotalamusz bázisán elhelyezkedő nucleus arcuatusban (ARC) lévő neuronokon a zsírraktárak teltségét jelző hormonok receptorai találhatók. Két eltérő funkciójú neuronscsoport van, az egyikbe az orexigén (táplálékfelvételt indukáló), a másikba az anorexigén (táplálékfelvételt elutasító) projekció fut be. Az expresszáldó neuropeptidok a perifériás jeleket közvetítik, az étvágyat fokozók az orexigének, az étvágyat csökkentők az anorexigének. A legfontosabbakat a **II. táblázat** foglalja össze [7, 8].

Az orexigén NPY fokozza a táplálékfelvételt, stimulálja a lipogén enzimeket a májban és a zsírszövetben. Dryden és munkatársai kimutatták, hogy elhízott patkányokban (Zucker patkányok) az NPY mRNS és NPY szint is megnövekedett, ami magya-

rázatot adott a patkányokban észlelhető hiperfágiára (túlevés) és csökkent energialeadásra, vagyis az NPY termelődésének zavara egy fontos tényező lehet az elhízás kialakulásában [9].

Az AGRP a melanokortin-4 (MC4) receptor antagonistája, vagyis gátolja a pro-opiomelanokortin (POMC) származékainak az MC4 receptoron kifejtett hatását (ld. később) [10]. Az AGRP szint megnövekedése az MC4 receptor tartós gátlása miatt túlzott étvággal (hiperfágia) és elhízással párosul [11].

A melaninkoncentrááló hormon (MCH) egy ciklikus fehérje, amely a laterális hipotalamuszban termelődik. Marsh és munkatársai vizsgálata alapján az MCH receptor hiányában a vizsgált egerek soványak és hipofágiások, emellett súlyos viselkedési zavarokat (hiperaktivitás) is leírtak [12]. Bizonyos tanulmányok szerint az MCH előidézhethet depresszív és szorongó viselkedést, így MCH receptor antagonistákkal az elhízás és a depresszió bizonyos formái is kezelhetővé válhatnak [13].

Az orexinek (hipokretinek) a laterális hipotalamuszban termelődő neuropeptidok, amelyek a táplálékfelvétel szabályozása mellett az alvás-ébrenlét ciklusban is szerepet játszanak. Az orexinnek két izoformáját különböztethetjük meg (orexin A és B), amelyek közül az orexin A nagyobb biológiai szereppel bír. Két G-fehérje receptorhoz [orexin 1- és 2- típusú receptor (OX1 és OX2)] kötődve fejtik ki hatásukat [14]. Az orexinek az OX1 receptoron keresztül összekapcsolják az evést és a pihenést a táplálkozás-alvás cikluson keresztül. A fejlesztés alatt lévő kismolekulás orexigén receptor antagonistáktól elsősorban az alvás-ébrenlét szabályozásának zavarai járó betegségek kezelését várhatjuk, de emellett e szerek szedése testtömegcsökkenéssel is párosul az éhségérzet elnyomása miatt [15].

A galanin három G-fehérje kapcsolt receptoron fejthet ki hatást. Számos biológiai funkcióban részt vesz, mint nocicepció, kognitív funkció, alvás-ébrenlét ciklus szabályozása, hangulat szabályozása és táplálkozás. A megnövekedett galanin szint el-

*II. táblázat*

#### *Orexigén és anorexigén neuropeptidok*

Orexigének	Anorexigének
Y-neuropeptid (NPY)	Pro-opiomelanokortin (POMC)/ $\alpha$ -MSH
Agouti related protein (AGRP)	Kortikotropin-felszabadító hormon (CRH)
Melaninkoncentrááló hormon (MCH)	Tireotropin-felszabadító hormon (TRH)
Orexin A és B (hipokretin 1 és 2)	Kokain-amfetamin regulált transzkript (CART)
Galanin/GALP	
Endokannabinoidok	

hízást okoz, továbbá az elhízásban megnövekedett galanin aktivitás növelheti az érzékenységet a fájdalomra [16].

Az endogén kannabinoidok is orexigén hatásúak. Receptoraik az endokannabinoid receptorok (CB1, CB2), a CB1 főleg az agyban, a CB2 nagyrészt az immunrendszer sejtjein található. Az endokannabinoidok a CB1 receptorokon keresztül a táplálkozás örömszerző voltát erősítik. Perifériásan (pl. a zsírszövetben, a májban, a gasztrointesztinális traktusban) is található CB1 receptorok, amelyek stimulálhatják a lipogenezist [17]. Elhízásban az endokannabinoid rendszer túlműködik, így ez fontos célpont a gyógyszeres kezelésében [18].

A nucleus arcuatusban az anorexigén szignálmolekulákat termelő sejteket POMC/CART-neuronoknak nevezzük. A pro-opiomelanokortin neuronok (POMC-neuronok) neurotranszmittere a POMC származéka, az  $\alpha$ -MSH. Az anorexigén neurotranszmitterek a melanokortin receptorokat (MC4 és MC3) serkentve csökkentik a táplálékfelvételt. Az MC4-receptorokon az AGRP antagonistá hatást fejt ki. A leggyakoribb monogén mutáció, amely elhízást okoz, az MC4-receptor defektusa. MC4 hiányos egerekben elhízás és hiperfágia megfigyelhető, így az MC4 agonisták potenciális elhízás elleni hatóanyagok [19].

A másik fontos anorexigén szignálmolekula a kokain-amfetamin regulált transzkript (CART). A CART csökkenti az étvágyat, de az energiafelhasználásra nincs hatással. A CART gén mutációja elhízással jár [20].

A CRH is anorexigén hatású. Növeli az energialeadást azáltal, hogy fokozza a szimpatikus aktivitást a barna zsírszövetben és a vesékben. Fokozott CRH termelés az Alzheimer-kór és a depresszió kialakulásával is kapcsolatba hozható. Két receptora ismert, a CRH-R1 és CRH-R2, ezek közül az utóbbi fontosabb az anorexigén hatás közvetítésében, befolyásolhatja a stressz indukálta táplálékfelvétel-csökkenést is [21]. A CRH-R1 receptor antagonistáktól szorongásos megbetegedések, agonistáktól az alkoholizmus kezelését várhatjuk.

A TRH egyaránt csökkenti a táplálék- és folyadékfelvételt. Magas vérnyomással rendelkező patkányokban TRH túlműködés figyelhető meg, így elképzelhető, hogy a TRH-nak szerepe van a magas vérnyomás és az elhízás kapcsolatában [22]. A TRH-TSH- pajzsmirigy (T3, T4) tengelynek az energiaforgalom szabályozásában kiemelkedő szerepe van (l. később).

A hipotalamusz területén található monoaminerg neuronok is részt vesznek az étvágyzabá-

lyozásban. A noradrenalin (NA) az  $\alpha_1$  receptoron hatva csökkenti az étvágyat, azonban az ugyanitt jelenlévő  $\alpha_2$  receptorokon növeli azt. Fontos célpont az elhízás kezelésében, ugyanis azok a gyógyszerek, amelyek növelik az endogén NA-t ( $\alpha_1$  receptor aktiválódik), csökkentik az étvágyat [23]. A dopaminszint az ízletes táplálékok elfogyasztása után emelkedik (aktiválódnak a mezolimbikus dopaminerg neuronok). Dopaminhiányban csökken a táplálékfelvétel és az étvágy. A dopaminerg projekció aktiválja az orexigén pályákat (D1 receptorokon keresztül), és gátolja az anorexigén pályákat (D2 receptorokon keresztül) [24]. Hasonlóan a kábítószer-függőséghez a szervezet a szükségletet meghaladó táplálékfelvételre törekszik, amely elhízáshoz vezethet [25]. A szerotoninszint táplálkozás során megnő a hipotalamuszban, feltételezhetően ez felelős a jóllakottságérzetért. Fontos receptorai az  $5HT_{1C}$ ,  $5HT_{1B}$ , amelyek hipofágiát és az  $5HT_{1A}$ , amely hiperfágiát indukál. A szerotonin az étkezések gyakoriságát és mértékét is szabályozza, továbbá növeli a szénhidrátbevitelt [24].

Az opioidok fokozzák a tápanyagbevitelt. Feltehetőleg a jutalmazási folyamatokban van szerepük. Ízletes ételek elfogyasztása után a hipotalamuszban megemelkedik a  $\beta$ -endorfin szint. Az opioid antagonisták a táplálékfelvételt rövidtávon csökkentik [26, 27].

#### *Perifériás szabályozó- és visszajelző rendszer*

A perifériás szabályozó és visszacsatoló rendszer igen komplex: adipozitási szignálokból, gasztrointesztinális hormonokból, citokinekből áll, emellett a tápanyagok összetevői – glükóz és a zsírsav-oxidáció termékei – is visszajelzést adnak. Az adipozitási szignálok képződése a zsírszövet mennyiségével arányos, bejutva a központi idegrendszerbe specifikus receptorokhoz kapcsolódnak. A receptorok aktivációja a táplálékfelvétel csökkenéséhez vezet (anorexigén hatású). Az inzulin és a leptin a szervezet energiaellátottságát jelzi, és a hosszútávú szabályozás képviselői. Továbbá újabb tanulmányok az adiponektin (egy adipocitokin) ellentétes szabályozó hatását írták le, vagyis az adiponektin szintje fordítottan arányos a zsírszövet mennyiségével és a táplálékfelvételt fokozva éhezési szignálként szolgál [28].

Az inzulin egy jelentős „adipostat” faktor, amely a vér-agy gáton telíthető, receptor-mediálta transzporttal jut át. Az inzulinszint nagymértékben függ a perifériás inzulinrezisztencia mértéké-



tól, ami arányos az elhízással. Azonban elhízás esetén nemcsak perifériásan, hanem centrálisan is megfigyelhető az inzulinrezisztencia, ami az aktív transzport csökkenésével magyarázható. A táplálékfelvétellel előidézett inzulin elválasztása elősegíti a zsírsav-szintézist, gátolja a glükoneogenezist és leállítja a felesleges többlet-táplálékfelvételt. Az inzulin csökkenti az NPY- és az AGRP-elválasztást (anorexigén hatású). Az inzulinhiányban szenvedő betegben nem csökken az NPY/AGRP-szintézis, így a beteg folyamatos éhségérzetet érez (diabéteszes hiperfágia). A receptoraktiváció hatására a szimpatikus aktivitás is fokozódik, a noradrenalin visszavétel gátlódik, ami elősegíti az energialeadást. A mezolimbikus dopaminerg pályákat is aktiválja, amely a jutalmazási és megerősítési reakciókért felelős [29].

A leptin kiemelt jelentőségű „adipostat” hormon. Ez a peptidhormon a *lep* (vagy más néven *ob*) gén terméke, és az adipocitákon kívül kisebb mértékben a gyomornyálkahártyában is expresszálódik. A leptinszekréció arányos a zsírtartalommal. A hipotalamuszon keresztül csökkenti a táplálékfelvételt és növeli a hőtermelést. A leptin működését illetően nagy az egyének és nemek közötti eltérés; a nők leptinszintje magasabb. Az energiaegyensúly gyors változásai során a leptinszekréció átmenetileg függetlenné válhat a testzsír mennyiségétől. A leptin hatással van a nemi működésre (hiányában szünetelnek a szaporodási folyamatok), fokozza a mellékvesekéreg és a pajzsmirigy hormontermelését. Befolyásolja az immunrendszer működésének a tápláltsági állapottal összefüggő változásait. A gyulladásos folyamatok és a krónikus glükokortikoid hatás emeli a leptinszintet. A leptin a citokinreceptorok szupercsaládjába tartozó leptin receptorokon (OB-R) fejt ki hatásait. A szignálmolekula a vér-agy gáton telíthető, aktív transzporttal jut át. Az OB-R receptor aktivációja egy szignál kaszkádot indít be, ami csökkenti az orexigén molekulák – NPY, AGRP, MCH, orexinek – expresszióját, ugyanakkor fokozza a POMC-neuronok melanokortin kifejeződését, és a CART és CRH expressziót, tehát anorexigén hatású [30]. A legtöbb elhízott emberben a leptinszint emelkedett, mégsem megfelelő a táplálékfelvétel gátlása. Ez a leptin rezisztenciával magyarázható, ami általában az elhízással párhuzamosan alakul ki, de a korábban meglévő csökkent leptinhatás is szerepet játszhat az elhízásban. Az örökletes leptinhiány nagyon ritka, és következményeit rekombináns leptin adásával meg lehet szüntetni [31]. A periférián hatva gátolja a zsírszöveten kívüli trigli-

cerid lerakódást, és serkenti a zsírsav-oxidációt. Patkányokon végzett kísérlet alapján a perifériásan adott leptin csökkentette a tápanyagbevitelt, serkentette a lipolízist, és csökkentette a vérnyomást [32, 33].

Az adiponektin egy 244 aminosavból álló fehérje, amely két adiponektin receptoron fejt ki hatását (AdipoR1 és AdipoR2). Javítja az inzulin érzékenységet, és elhízásban csökken a plazmaszintje, ami inzulinrezisztenciát okozhat. Kis molekulatömegű AdipoR agonisták mérsékelhetik az elhízáshoz társuló 2-es típusú cukorbetegséget [34]. Az adiponektin antiaterogén hatással is rendelkezik, gátolja a sejtadhéziós molekulák expresszióját. Nemrég fedezték fel centrális hatásait, amelyek elmentések a leptin hatásaival a hipotalamuszban. Ugyanazokon a neuronokon hatva fokozza a táplálékfelvételt, és csökkenti az energialeadást. Hatására az NPY expresszió fokozódik, míg a POMC expresszió csökken [35, 36].

A zsírszövet citokineket bocsát ki, amelyek az adipocitákban vagy a jelenlévő makrofágokban keletkeznek, szintjük elhízásban megemelkedik. A citokinek közé tartozik az interleukin-6 (IL-6), a tumor nekrozis faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és a monocita kemoattraktáns fehérje-1 (MCP-1) is. Szerepük lehet az elhízáshoz társuló betegségek kialakulásában (cukorbetegség, szív- és érrendszeri betegségek) [37]. Anorexia nervosában megemelkedett citokinszintet (pl. TNF- $\alpha$ , IL-6) mértek, amely anorexigén hatásukra utal [38]. A rezisztin egy adipocitokin, amelynek szintje megemelkedik a zsírszövet növekedése során, fő termelődési helye a zsírszöveti makrofágok [39]. Állatkísérletek során magas szintje párhuzamba hozható az inzulin érzékenység csökkenésével [40].

A gyomor-bélrendszerből különböző hormonális és neurális ingerek származnak. Fontos szerepet játszanak az elhízás kialakulásában, így effektív és biztonságos lehet a gasztrointesztinális hormonokra alapozott terápia. Az egyetlen eddig ismert éhséget jelző molekula a grelin. A grelin szintje éhgyomorra magas, táplálkozás után egy órán belül lecsökken, szerepe tehát az étkezés megkezdésében és befejezésében is jelentős. A grelin eltolja a preferenciát a zsírdús ételek felé. Az éhomi grelin plazmaszint elhízásban alacsonyabb, mint anorexiában. Azonban elhízásban táplálkozás utáni plazmaszint csökkenése kevésbé kifejezett, ami elősegíti a fokozott energiebevitelt. A grelin a hipotalamuszban fejt ki orexigén hatását (aktiválja az NPY/AGRP-sejteket), így elősegítve a zsírrakkumulációt az adipocitákban [41, 42]. A

jutalmazó pályákra is hatással van, amellyel szintén növeli a táplálékfelvételt [43]. A jóllakottsági szignálok a nervus vaguson keresztül közvetítik a gyomor teltségérzetét, a táplálékfelvétel rövidtávú szabályozásában vesznek részt. A gasztrointesztinális hormonok közé tartozik a peptid YY (PYY), a kolekisztokinin (CCK), a pankréász polipeptid (PP), a glükózdependens inzulinotrop peptid (GIP), a glukagon-szerű peptid 1 (GLP-1), az amilin és az oxintomodulin. Étkezés után szekréciójuk fokozódik, éhezéskor csökken. Csökkentik a gyomormotilitást és a központi idegrendszerben jóllakottságot keltenek. A GLP-1 táplálékfelvétel-függő módon keletkezik a hasnyálmirigy endokrin sejtjeiben és a gyomor-bél traktus egyéb endokrin elemeiben. A GLP-1 és a GIP (inkretinek) fokozzák a posztprandriális inzulin szekréciót, az inzulin bioszintézist és a hasnyálmirigy Langerhans-szigetsejtek proliferációját is [41]. A GLP-1 analógokat eddig a 2-es típusú cukorbetegség kezelésére alkalmazták, használatuk során testsúlycsökkenés figyelhető meg [44].

A pajzsmirigyhormonok a szervezet valamenyinyi sejtjének aktivitására befolyással vannak. Felszabadulásukat a hipotalamusz (TRH)- hipofízis (TSH)- pajzsmirigy ( $T_3$ ,  $T_4$ ) tengely szabályozza. A már említett TRH-nak anorexigén hatása van. A TSH szint pozitív korrelációban van a BMI-vel. A határérték feletti TSH szint csökkenti a testtömegcsökkenést hormonterápia nélkül [45]. A pajzsmirigyhormonok a génátírást szabályozzák, receptoraik a nukleáris receptor szupercsaládba tartozó tiroid hormon receptorok (TR). Nő a  $Na^+/K^+$  ATPáz expressziója, a mitokondriumok száma és egyéb metabolikus, növekedésben és fejlődésben szerepet játszó fehérjék átírása. Ezek következtében fo-

kozódik az oxigénfogyasztás, az alapanyagcsere és a hőtermelés. A fokozott oxigénfogyasztás kielégítésére nő a perctérfogat és a légzés mértéke, továbbá nő a tápanyag-felszívódás és az endogén raktárak is mobilizálódnak, ami testsúly csökkenést okoz [7, 46]. A pajzsmirigyhormonok két receptor izoformán fejthetik ki a hatásukat. A pajzsmirigyhormon-receptor (TR)  $\alpha$  elsősorban a szívben található és a vegyületek szívhatásaiért felel. A tiroid receptor másik izoformája a  $TR\beta$ , elsősorban a májban található. A  $TR\beta$  receptor aktiválódása növeli az alapanyagcserét, illetve az alapenergia-forgalmat, ami fogyással párosul. Mindezen hatások a káros szívhatások nélkül érényesülhetnek, így elhízás kezelésében a  $TR\beta$  szelektív vegyületeket kutatják [47].

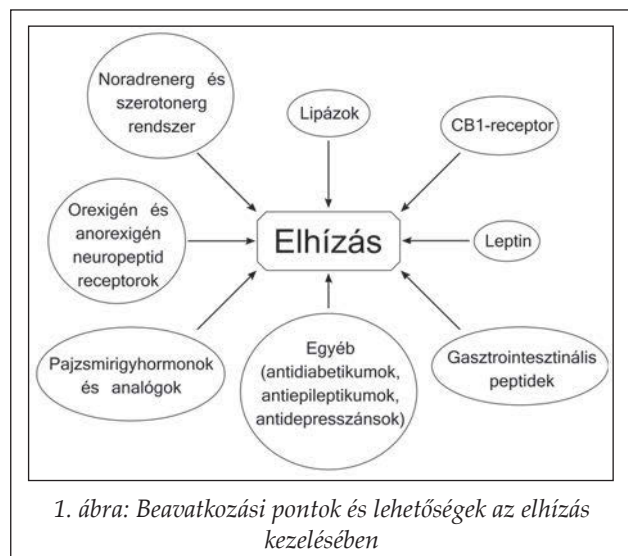
### Az obezitás kezelésében alkalmazott gyógyszerek csoportosítása

Az elhízás elleni készítmények egy részének egyedüli indikációja az elhízás. Emellett vannak olyanok is, amelyeket az elhízott betegek a krónikus társbetegségekre (pl. cukorbetegség, depresszió) kapnak, de kedvező hatással van a testsúlyukra. Bármelyik hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszer eredményességéhez fontos a megfelelő diéta és fizikai aktivitás [48-52]. Az **1. ábrán** foglaltuk össze a legfontosabb gyógyszeres beavatkozási lehetőségeket az elhízás kezelésében.

Az elhízás elleni szereket csoportosíthatjuk az alábbi szempontok szerint:

1. Centrálisan ható étvágycsökkentők. Ide tartoznak azok a vegyületek, amelyek a központi idegrendszeri orexigén/anorexigén pályákat befolyásolják, a noradrenerg és szerotonerg rendszerre ható vegyületek, amelyek gátolják az energiabevitelt, az antidepresszáns és hangulatstabilizáló szerek egyes csoportjai, továbbá a kannabinoid receptor antagonisták.
2. Egy másik csoportba tartoznak a gasztrointesztinális traktusban ható szerek, amelyek a zsírszorbpciót gátolják. Ide tartoznak például a pankréász lipáz gátlók és a gasztrointesztinális peptidek.
3. Energialeadást serkentő szerek, amelyek a periférián hatva növelik a hőtermelést, anélkül, hogy a fizikai aktivitást növelni kéne. A pajzsmirigyhormon-receptoron ható vegyületek is ide sorolhatók.

A legfontosabb hatóanyagokat, a molekuláris célpontot, a vegyületek hatásmechanizmusát a **III. táblázat** tartalmazza.



III. táblázat

Elhízásban alkalmazható gyógyszerek csoportjai az egyes hatóanyagokkal

Hatóanyag	Molekuláris célpont	Mechanizmus	Státusz
<b>Zsírabszorpciót gátlók</b>			
Orlisztát (Xenical, Alli)	Pankreász lipáz	A zsírabszorpció inhibitora	Magyarországon is forgalomban van
Cetilisztát	Pankreász lipáz	A zsírabszorpció inhibitora	Klinikai vizsgálatok alatt: Fázis III-ban
<b>Zsírmobilizációt serkentők</b>			
Metreleptin (Myalept)	OB receptor	Stimulálja a zsírmobilizációt	FDA által elfogadott (lipodisztrófiában)
<b>Energiabevitel gátlói (étvágycsökkentők)</b>			
Lorkaszerin (Belviq)	5-HT <sub>2C</sub> receptor agonista	Étvágycsökkentő	FDA által elfogadott
Fenfluramin	Szerotonerg neuronok	Gátolja a szerotonin visszavételt, és stimulálja a szerotonin felszabadulást	visszavonva
Dexfenfluramin (Redux)	Szerotonerg neuronok	Gátolja a szerotonin visszavételt, és stimulálja a szerotonin felszabadulást	visszavonva
Fenfluramin és fentermin (Fen/Phen)	Szerotonerg és noradrenerg neuronok	Gátolják a szerotonin és a noradrenalin visszavételt, és serkentik a szerotonin felszabadulást	visszavonva
Fentermin/topiramát (Qysmia)	Fentermin: szimpatomimetikus ágens	Étvágycsökkentő, nem teljesen ismert	FDA által elfogadott
	Topiramát: antikonvulzív ágens		
Fendimetrazin	Noradrenerg, dopaminerg neuronok	Noradrenalin és dopamin felszabadulás nő	FDA által elfogadott
Benzfetamin	Noradrenerg neuronok	Amfetamin-szerű étvágycsökkentő	FDA által elfogadott
Dietilpropion	Noradrenerg, (dopaminerg, szerotonerg neuronok)	Növeli a noradrenalin felszabadulást	FDA által elfogadott
Szibutramin (Meridia, Reductil)	Szerotonerg, noradrenerg neuronok	Szerotonin és noradrenalin visszavétel gátló	Számos országban visszavonták
Bupropion/naltrexon (Contrave)	Szerotonerg és opioid receptorok	Bupropion: noradrenalin és dopamin visszavétel gátló	FDA által elfogadott
		naltrexon: opioid receptor antagonist	
Rimonabant (Acomplia)	CB1 receptor antagonist	Étvágycsökkentő	visszavonva
<b>Egyéb</b>			
Metformin (Glucophage)	Glükoneogenesis gátlása, glükózfelhasználás növelése	Antidiabetogén hatás	Forgalomban van (antidiabetikus szerként)
Liraglutid (Saxenda)	GLP-1 analóg	Antidiabetogén hatás, növeli a telítettségérzést	Forgalomban van
Exenatid (Byetta)	GLP-1 analóg	Antidiabetogén hatás, növeli a telítettségérzést	Forgalomban van (antidiabetikus szerként)
Pramlintid (Symlin)	Amilin analóg	Növeli a telítettségérzést	FDA által elfogadott (antidiabetikus szerként)

Az orlisztát, lorkaszerin, bupropion/naltrexon és a fentermin/topiramát kombináció az elhízás hosszú távú kezelésére alkalmasak. Ezzel szemben a benzfetamin, a dietilpropion, a fendimet-razin és a fentermin kizárólag az elhízás rövidtávú kezelésére alkalmazhatók [3, 51].

#### *Az elhízás kezelése a múltban*

A XX. század elején és közepén az elhízás farmakoterápiájában alkalmazott szerek súlyos mellékhatások miatt kivonásra kerültek.

Az elhízás kezelésében használt első gyógyszerek a pajzsmirigyhormonok voltak. Habár az exogén  $T_4$  és  $T_3$  gyors testtömeg-csökkenést okoz, ez az izomtömeg (zsír nélküli testtömeg) veszteségében nyilvánul meg (akár 80%). A pajzsmirigyhormonok hosszas bevitele tiroid atrófiát okozott, továbbá súlyos kardiovaszkuláris problémák jelentkeztek: tahikardia, kamrai aritmia. Ezek következtében számos haláleset is történt. Elhízás kezelésére ezek a szerek emiatt nem alkalmazhatók. Érdekes megjegyezni, hogy egy 2009-es felmérés szerint az elhízott betegek 21%-ában hipotireózis mutatható ki [50]. Látens hipotireózis rutinszerű kezelése, a nagyobb kockázat miatt nem javasolt, de manifest hipotireózisban a megfelelően adagolt pajzsmirigyhormon testtömeg-csökkentő hatása kihasználható [3].

A dinitrofenol egy respirációs mérgező, amely szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt a mitokondriumban (ATP helyett hő termelődik) és növeli a metabolizmus mértékét. Alkalmazták pajzsmirigyhormonokkal kombinációban, amellyel gyors testtömeg-csökkenést értek el. Azonban túladagolva halálos hipertermiát okozhatott és to-

vábbi mellékhatásként katarakta, dermatitisz, agranulocitózis, hepatotoxicitás is kialakulhatott, emiatt kivonták a forgalomból [53].

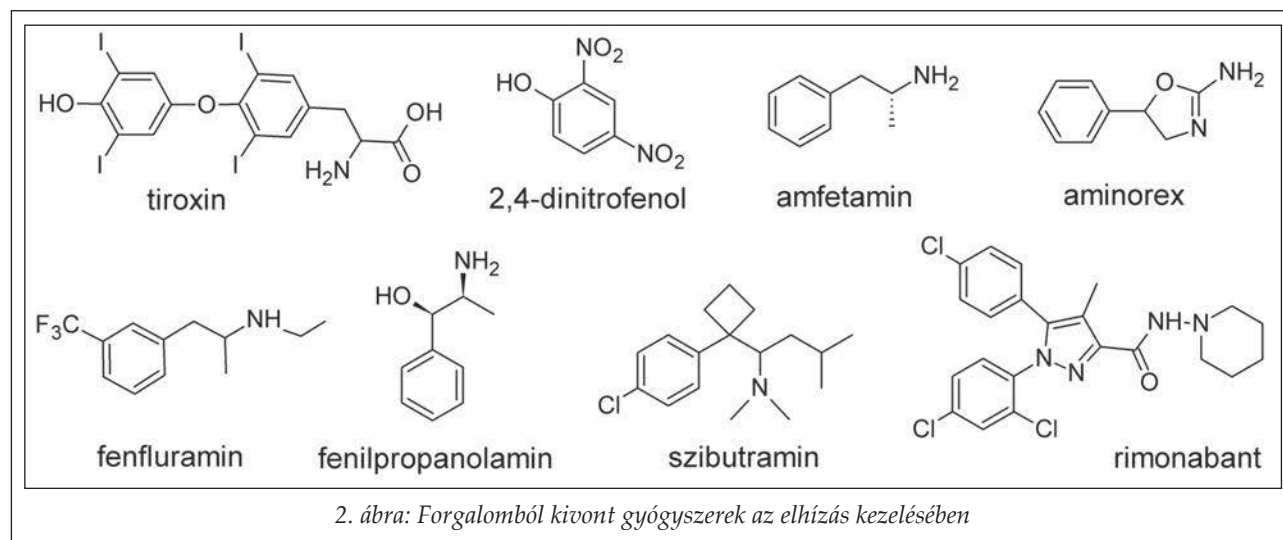
Az amfetamin is széles körben alkalmazott gyógyszer volt az elhízás kezelésében. Étvágycsökkentő, szimpatomimetikus és központi idegrendszeri stimuláns hatással rendelkezik. Létezett egy ún. „Rainbow Pills” készítmény, amely amfetamint tartalmazott pajzsmirigyhormonnal, digitálissal és diuretikumokkal kombinálva. Ez olyan súlyos mellékhatásokat okozott, mint függőség, hipertónia, miokardiális toxicitás és hirtelen halál [3].

Az aminorex (2. ábra) egy amfetamin-szerű gyógyszer. Káros hatásként pulmonális hipertóniát észleltek, illetve prekapilláris érelzáródást okozott, emiatt visszavonták. A vegyület ma már tiltólistán van, kábítószernek minősül [49].

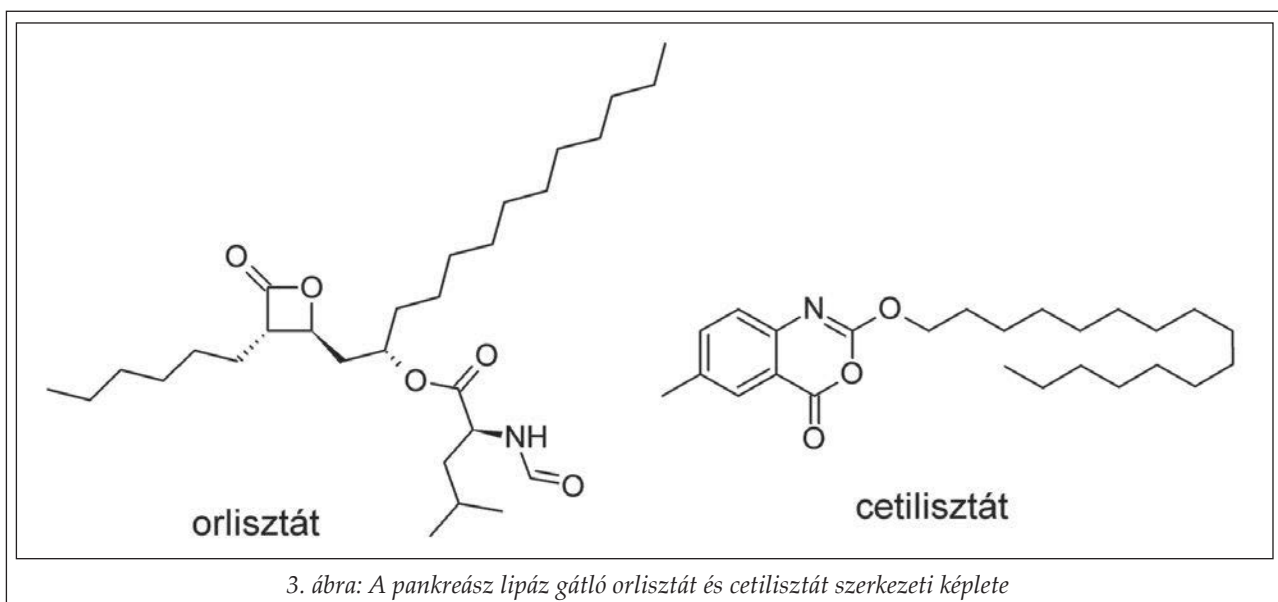
A fenfluramin (2. ábra) serkenti a szerotonin felszabadulást és gátolja a preszinaptikus újrafelvételt anélkül, hogy szimpatomimetikus vagy központi idegrendszeri stimuláns hatásai lennének. A szimpatomimetikus fenterminnel való kombinációja (Fen/Phen) hatásos terápiának bizonyult az elhízás krónikus kezelésében, azonban súlyos szív- és érrendszeri mellékhatásai miatt kivonták a forgalomból [3, 49].

A szimpatomimetikus fenilpropanolamin (PPA) számos étvágycsökkentő, köhögés és meghűlés elleni gyógyszer komponense volt. 2000-ben étvágycsökkentőként való felhasználását megtiltották, mert kapcsolatba hozták haemorrhágiás stroke előfordulásával [49, 54].

Az efedrint használták étvágycsökkentőként, mert növeli a hőtermelést a barna zsírszövetben. Koffeinnel vagy más xantinszármazékkal kombi-









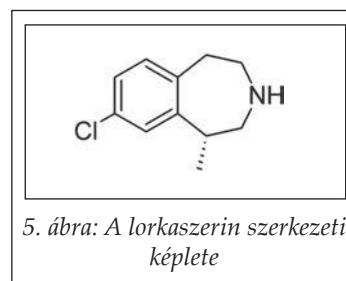
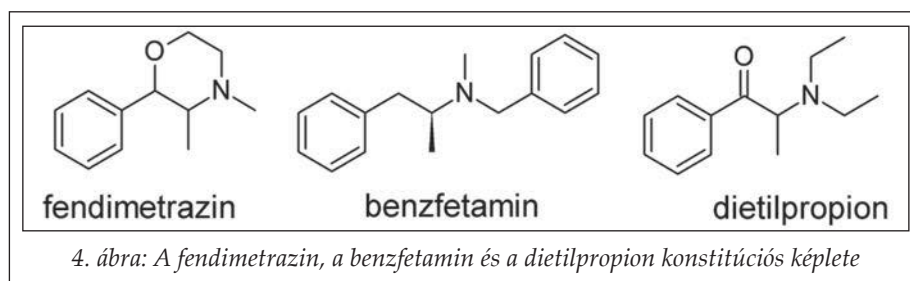
orlisztáttal és életmódváltással jó eredmény érhető el a 2-es típusú cukorbetegség megelőzésében is. Emellett a gyógyszer javulást eredményez a kardiovaszkuláris rizikófaktorokban (vérnyomásban, koleszterinszintben, vércukorszintben). Az orlisztát a visszahízással szemben is védelmet nyújt [3, 51]. Szisztémás mellékhatásokkal nem rendelkezik. Alkalmazása során a zsírszintben oldódó vitaminok (A, D, E, K) felszívódása csökken, így ezeket pótolni kell. Gasztrointesztinális mellékhatásai kellemetlenek: laza széklet, megnövekedett székelési inger (akár inkontinencia), zsírszékelés, flatulencia [51]. A cetilisztát az orlisztát szerkezeti rokona (**3. ábra**). Klinikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a vegyület szignifikáns testsúlycsökkenés mellett jobb mellékhatás-profillal rendelkezik, mint az orlisztát [3]. További kedvező hatása, hogy csökkenti a koleszterinszintet, a cukorbetegségben pedig a HbA<sub>1c</sub>-szintet. Japánban már elfogadták a komplikált obezitás kezelésére [57].

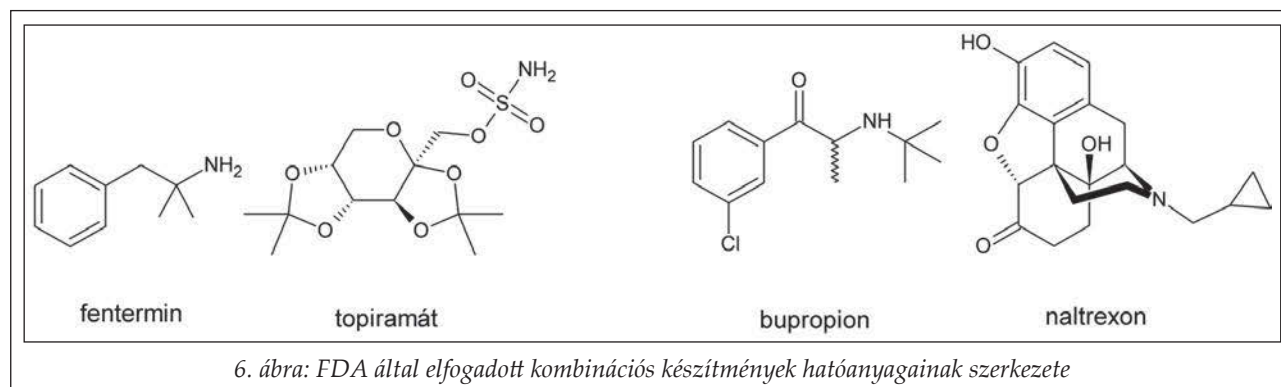
Az FDA által elfogadott hatóanyagok az amfetamin-szerű fendimetrazin, benzfetamin és dietilpropion (**4. ábra**). Rövidtávú – maximum 12 hetes – alkalmazásuk javallott. Mindhárom szimpatomimetikus vegyület gátolja a noradrenalin újrafelvételét az idegvégződéseken, ezáltal csökkentve az étvágyat. Mellékhatásaik a szimpatomimetikus hatóanyagokra jellemzőek, pl. aritmia, hipertónia, alvászavarok, hányinger, székrekedés, szájszárazság, fejfájás. Kardiovaszkuláris zavarok esetén nem alkalmazhatók. Függőséget okozó mellékhatásuk nem bizonyított, de korábbi drogabúzus esetén nem ajánlják őket [3, 51]. Bár ezek a szerek az USA-ban törzskönyvezve vannak, de abúzus-potenciáljuk miatt ritkán használják őket.

Az FDA 2012-ben törzskönyvezte a lorkaszerint (Belviq, Lorcress), amely egy szelektív, nagy affinitású 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonista, az elhízás hosszú távú kezelésére (**5. ábra**). Ezt a gyógyszer-csoportot ajánlják más indikációkban is, mint a depresszió, a szorongás és a skizofrénia [58]. Forgalomban a vegyület hidroklorid sója van, és csak az R enantiomer, annak ellenére, hogy az S enantiomer is hasonló hatású. Lipofilitása viszonylag magas,

(logP≈3), szekunder amino csoportja a báziscentrum, pK<sub>a</sub> értéke 9,9. Az 5-HT<sub>2</sub> receptor alcsaládnak három altípusa van, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, amelyek jelentős szekvencia homológiát mutatnak. Az 5-HT<sub>2C</sub> túlnyomórészt a központi idegrendszerben expresszálódik. A nucleus arcuatusban a receptor aktivációja stimulálja a POMC produkcióját, amiből kihasad az α-MSH, ami a melanokortin-4 receptorokon jóllakottság érzetet indukál. A lorkaszerin a dopaminerg rendszeren keresztül az étkezés kognitív-örömszerző voltára is befolyással van. Az 5-HT<sub>2A</sub> receptorok aktivációja hallucinációkat okozhat, az 5-HT<sub>2B</sub> receptorok aktivációja szívbillentyű-elégtelenséghez és pulmonális hipertóniához vezethet. Az 5-HT<sub>2C</sub> receptorokhoz való szelektív kötődés e mellékhatások elkerülését eredményezi. A lorkaszerin intenzíven metabolizálódik a májban és gátolja a CYP2D6 metabolizáló izoenzimet [59]. *In vitro* vizsgálatok szerint a lorkaszerinnek nincs szimpatomimetikus hatása [58]. Három különböző fázis III vizsgálatot végeztek (BLOOM, BLOSSOM, BLOOM-DM – ez utóbbiakban cukorbetegségben szenvedő betegek voltak az alanyok). Ezek során megállapították, hogy a lorkaszerin alkalmazásával szignifikánsan csökken a testtömeg (átlagosan 5,8%-kal, de 10%-os csökkenés is lehetséges). Emellett a vegyület javítja a súlycsökkenés megtartását. A HbA<sub>1c</sub> szintet is csökkenti, azonban tüneti hipoglikémia gyakoribb volt a lorkaszerin csoportban, mint a placebo csoportban. Leggyakoribb mellékhatásai a zavartság, fejfájás, szájszárazság, hányinger, székrekedés, kimerültség. Cukorbetegségben előfordult hipoglikémia, köhögés és hátfájás. A lorkaszerin jól tolerált gyógyszer, nagyon ritka esetekben okozhat szívbillentyű-elégtelenséget és elváltozást az echokardiogramon. A farmakovigilancia során különös figyelmet szentelnek többek között a kardiovaszkuláris és pszichiátriai mellékhatásokra [60].

Az utóbbi években az FDA engedélyezett két kombinációs készítményt – fentermin és topiramát, illetve bupropion és naltrexon – az elhízás kezelésére. Ezekre a készítményekre általánosan jellemző, hogy a komponensek már korábban



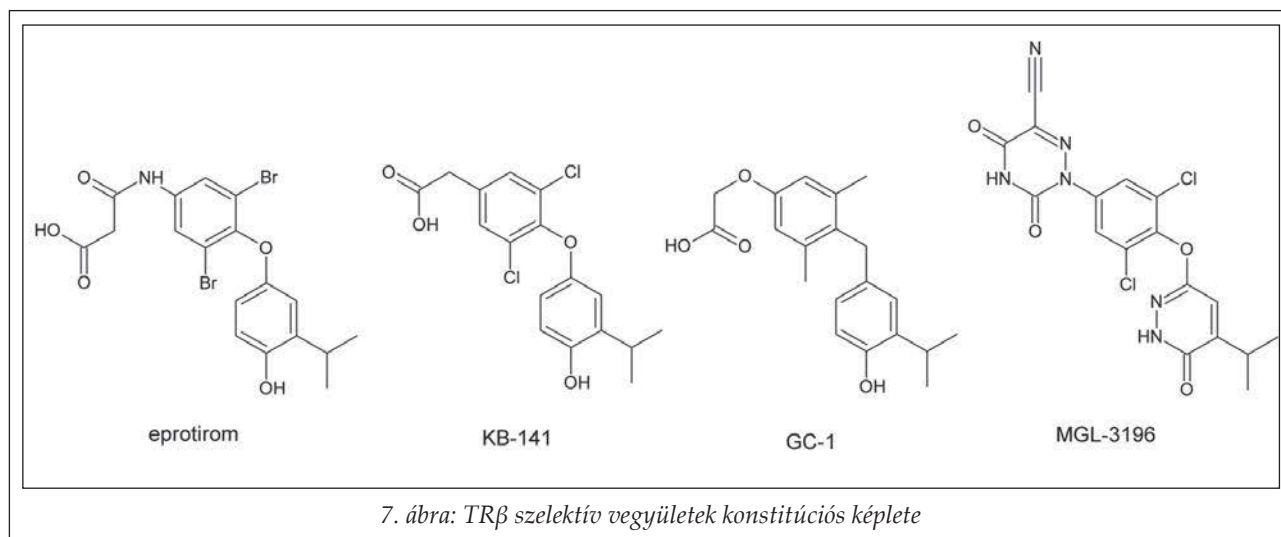


törzskönyvezésre kerültek monoterápiában, de a kombináció legalább egyik komponense nem elhízás elleni készítményként lett kifejlesztve, így mellékhatásokra lehet számítani. Az egyes szerek potenciórozzák egymás hatását, emiatt a kombináció alacsonyabb dózisban tartalmazza a hatóanyagokat, mint monoterápiában, ami csökkenti a mellékhatások előfordulását. Az elfogadott új kombinációk mellett újak megjelenés is várható. A bupropion zonisamid kombináció klinikai vizsgálatok alatt áll [61], míg a Richter Gedeon Nyrt. jelenleg a memantin és baklofen kombinációját kutatja az elhízás kezelésére [62].

2012-ben fogadta el az FDA a fentermin/topiramát kombinációt (Qsymia) a krónikus elhízás kezelésére. A tableta közvetlen hatóanyag felszabadulású fentermint és nyújtott hatóanyag leadású topiramátot tartalmaz. A fentermin egy szimpatomimetikus étvágycsökkentő szer, a topiramát egy szulfamát-szubsztituált, fruktózhhoz kapcsolt monoszacharid, antiepileptikus, migrénellenes gyógyszer. A pontos hatásmechanizmusuk nem ismert. A topiramát fokozza a gamma-aminobutirát (GABA) aktivitását, modulálja a feszültségfüggő ioncsatornákat, gátolja az AMPA/kainát excitátoros glutamát receptorokat, és gátolja a karbonanhidrázt. A fentermin egy atípusos amfetamin származék, ennek ellenére központi idegrendszeri stimuláció, vérnyomás emelkedés és tahifilaxia nem volt megfigyelhető a klinikai vizsgálatok során. Kettő fázis II tanulmányt végeztek elhízott önkénteseken, akiknek más társbetegségük is volt - egyik esetben 2-es típusú cukorbetegség, a másik esetben obstruktív alvási apnoe. Az első esetben kedvezőbb glikémiás kontrollt lehetett elérni a kísérleti csoportban. A második esetben pedig szignifikáns javulást tapasztaltak alvási apnoében, így a gyógyszer új gyógymód lehet az obstruktív apnoe kezelésében is. A gyógyszer hatékonyságát és biztonságát négy fázis III tanulmányban vizsgálták. A legnagyobb tanulmányt (CONQUER) olyan

egyének végezték, akiknek társbetegségekkel is rendelkeztek (hipertónia, diszlipidémia, prediabetes, 2-es típusú cukorbetegség). A testsúly-csökkentés mellett a kardiometabolikus rizikó faktorokban is javulás volt észlelhető a placebo csoporthoz képest. A kombináció képes volt megelőzni a 2-es típusú cukorbetegség kialakulását. A készítmény jól tolerálható, gyakori mellékhatásai a paresztézia, szájszárazság, székrekedés, szédülés és hányinger. A szívfrekvencia enyhe emelkedését tapasztalták, de ez nem járt káros következményekkel. Neuropszichiátriai zavarokat is megfigyeltek (depresszió, szorongás, inszomnia, figyelemzavar). A topiramát az öngyilkossági hajlamot növelheti, de a kombináció a tanulmányok során nem növelte a szuicid viselkedést. A karbonanhidráz gátlás miatt (topiramát) a szérumbikarbonát koncentráció kicsit csökkent, de ezt a szervezet beavatkozás nélkül kompenzálni tudta. A farmakovigilancia alatt különösen a szív- és érrendszeri eseményeket követik figyelemmel [63, 64].

2014 szeptemberében fogadta el az FDA a Contrave [naltrexon/bupropion] tablettát az elhízás hosszú távú terápiájára. A naltrexon opioid antagonist, alkohol és opioid függőségre törzskönyvezték, a bupropion depresszió kezelésére és a dohányzástól való leszoktatásra alkalmazzák. Mindketten külön-külön rendelkeznek testsúlycsökkentő hatással, együtt potenciórozzák egymás hatását [64]. Támadáspontjuk a hipotalamikus melanokortin rendszer és a mezolimbikus jutalmazó pálya. A bupropion noradrenalin és dopamin visszavétel gátló, stimulálja a POMC-neuronokat, így  $\alpha$ -MSH és  $\beta$ -endorfin keletkezik. Az  $\alpha$ -MSH az anorexigén pálya mediátora, a  $\beta$ -endorfin pedig a negatív visszacsatolásért felelős, vagyis inaktíválja az anorexigén hatást. A naltrexon blokkolja az opioid receptorokat a POMC-neuronokon, így meggátolja a negatív visszacsatolást. A kombináció a dopaminerg jutalmazó pályán keresztül irányítja az étel iránti sóvárgást és a túlevést [65].



Mindkét vegyület intenzíven metabolizálódik a májban, a naltrexonból keletkező 6- $\beta$ -naltrexon aktív vegyület, míg a bupropion esetében több aktív metabolit is keletkezik [66]. A klinikai vizsgálatok során a testtömeg legalább 5%-os csökkenését tapasztalták. A kombináció pozitív hatással van a lipidprofil összes komponensére (LDL-, HDL-koleszterin, trigliceridek) és az inzulinrezisztenciára. A HbA<sub>1c</sub> szint is szignifikánsan csökkent a placebohoz képest. A naltrexon/bupropion kombináció leggyakoribb mellékhatásai gyomor-bél panaszok (hányinger, hányás, székrekedés vagy hasmenés) emellett szájszárazság, szédülés és fejfájás is előfordul. A kombinációt elővigyázatossággal kell alkalmazni, mert a bupropion szuicid gondolatokat és viselkedést okozhat. Figyelni kell a szív- és érrendszeri betegségekre is, ugyanis megemelt a vérnyomást és a szívfrekvenciát [64, 65].

A liraglutid (Victoza) egy GLP-1 analóg, amit a 2-es típusú cukorbetegség terápiájában már alkalmaztak, de emellett szignifikáns testtömeg-csökkenés is elérhető vele [60]. A liraglutidot tartalmazó Saxenda injekciót 2014 decemberében fogadta el az FDA az elhízás krónikus, adjuváns kezelésére. Ez a készítmény hatóanyag-mennyiségben eltér a Victoza-tól, és kizárólag elhízás ellenes szerként törzskönyvezték, 2-es típusú cukorbetegség kezelésére nem alkalmazható. Átlagosan 4,5%-os súlycsökkenést lehet vele elérni. Kezelés során előfordulhatnak olyan súlyos mellékhatások, mint hasnyálmirigy-gyulladás, epehólyag betegség, veseelégtelenség és szuicid gondolatok. Emiatt fokozott figyelem kíséri a poszt-marketing után is [67]. A liraglutidhoz hasonlóan az exenatid, mint GLP-1 agonista hormon is törzskönyvezésre kerülhet elhízás kezelésére is [68].

Az oxintomodulin (OXM, gasztrointesztinális jóllakottsági szignál) csökkenti az étvágyat és a testtömeget, növeli az energialeadást a centrális GLP-1 receptor gátlása és a POMC-neuronok stimulációja révén. A hosszú hatású OXM analógok jelenleg fejlesztés alatt állnak [60].

A leptin egy kulcshormon az energia homeosztázis szabályozásában. A hormon szintetikus analógja a metreleptin (Myalept inj.), amit a cukorbetegség és hipertrigliceridémia kezelésével kapcsolatban kutatnak. Japánban már elfogadták alkalmazását metabolikus zavarokban, így lipodisztrófiában, és az Egyesült Államokban is helyettesítő terápia leptinhiányban szenvedő lipodisztrófiás betegekben [69]. Leptin génmutációban szenvedő súlyosan elhízott kislányt sikeresen kezeltek metreleptinnel, amely testtömeg-csökkenésben is megnyilvánult [70]. Azonban a legtöbb esetben a leptin rezisztencia miatt alkalmatlan az elhízás terápiájára, mellé a leptin receptorokat reszenzitizáló hatóanyag szükséges. Ilyen a pramlintid (amilin-analóg pankréász hormon, jóllakottságot indukál), amely a metreleptinnel kombinálva 12,7%-os súlycsökkenést ért el. Vizsgálják még az exendin-4 és a fibroblaszt növekedési faktor-21 leptin szenzitizáló hatását is. Pozitív eredmények esetén a metreleptin is egy lehetőség lesz az elhízás kezelésében [69].

Az előbb említett pramlintidet (Symlin) a diabétesz adjuváns terápiájában alkalmazzák. 2-es típusú cukorbetegség kezelése során testtömeg-csökkenést is tapasztaltak. A második generációs amilin-analóg daivalintid klinikai vizsgálatok alatt áll az elhízás kezelésére [71].

Számos más célpont is létezik az elhízás kezelésében, kutadják az MC4-receptor agonista pepti-

deket és az Y5-receptor (NPY receptora) inhibitorokat [60]. Az MCH1 receptor antagonisták is potenciális hatóanyagok lehetnek [72], illetve a  $\beta_3$  adrenerg receptor is az elhízás egyik molekuláris célpontja. Az adrenerg receptorok újabban felfedezett altípusa a  $\beta_3$  adenoreceptor, amelyek  $G_s$  fehérje kapcsolt receptorok és elsősorban a barna zsírszövetben, izomszövetben, húgyhólyagban található. A  $\beta_3$  receptorok serkentése a lipolízis és hőtermelés növekedését okozza patkányban és emberben egyaránt [73]. Jelenleg kettő vegyület áll fejlesztés alatt elhízás ellen (CL-316243, AJ-9677), amelyek az inzulinérzékenységet is javíthatják [74].

A pajzsmirigyhormon receptor béta szelektív szerektől az remélhető, hogy csekély mellékhatással érnek el testsúly-csökkentést és koleszterinszint-csökkentést is. A pajzsmirigyhormonok káros szívhatásaiért leginkább a pajzsmirigyhormon receptor alfa altípusa felel, így a pajzsmirigyhormon receptor béta szelektív szerekekkel ezek a mellékhatások elkerülhetők. Emiatt intenzív kutatás folyik TR $\beta$  szelektív szerek előállítására, mivel ezek a vegyületek mind az elhízás, mind a hiperkoleszterinémia kezelésében sikeresek lehetnek [75, 76]. A szelektív szerek szintézise azért nehézkes, mert a két izoforma kötőzsebe között egyetlen aminosav különbség van: a TR $\alpha$  szerinje (Ser277) helyett a TR $\beta$ -ban aszparagin (Asn331) található [77]. A TR $\beta$  szelektív KB-141 és GC-1 jelű vegyületek elhízás elleni, lipidszintcsökkentő és antidiabetikus hatását állatkísérletes eredmények alapján több közlemény is tárgyalja (7. ábra) [78-80]. A szelektivitás ellenére néhány kedvezőtlen szív- és pajzsmirigy-hatás miatt klinikai vizsgálatra nem kerültek. A belőlük kifejlesztett eprotirom, amely az említett vegyületek közül a legjelentősebb TR $\beta$  szelektivitást mutatja, és rövidtávú kezelés (kevesebb, mint 6 hónap) során számottevő mellékhatás nélkül csökkentette a koleszterinszintet és a testsúlyt, klinikai vizsgálatokra került. Azonban az eprotirom fázis III vizsgálatait 2012 februárjában a fejlesztő svéd Karo Bio cég beszüntette, mivel a humán vizsgálatokkal párhuzamosan zajló állatkísérletek során hosszantartó adagolás mellett (1 év után) porckárosító mellékhatást észleltek. Érdekes megjegyezni, hogy 6 hónapos kezelés során a porckárosító mellékhatás sem emberben, sem állatokban nem volt észlelhető, 3 hónapos kezelés után pedig már a koleszterinszint 30%-os csökkenéséről számoltak be [81]. A TR $\beta$  receptor szelektív szerek potenciális klinikai szerepe nyilvánvaló, azonban az eprotirom beszünte-

tett fázis III vizsgálata visszavetette a vegyületcsoport fejlesztését. Az előbb tárgyalt vegyületek mindegyike pajzsmirigyhormon analóg; a gyűrűrendszert csak kevésbé változtatták a liotironinhoz képest, jelentősebb változás pl. az eprotiromban az oldalláncban található (7. ábra). Általános szerkezet-hatás összefüggések felállítása nagyon nehézkes [82]. Az utóbbi évek fejlesztései azt mutatják, hogy a pajzsmirigyhormonokban található gyűrűrendszert heterociklusra lehet cserélni, amely változás a hatást nem befolyásolja, de a mellékhatások csökkenésével járhat. Számos indolszármazéknál bizonyítottak pajzsmirigyhormon-szerű hatásokat [83], míg bizonyos piridazinon alapvázú vegyületeknél jelentős TR $\beta$  szelektivitást lehet mérni. Fázis I vizsgálatok során az MGL-3196 kódszámú piridazinon alapvázú, az oldalláncban cianoazauracil részt tartalmazó vegyület (7. ábra) egészséges önkéntesekben csökkentette a koleszterinszintet anélkül, hogy jelentős mellékhatást okozott volna. Ezen új típusú vegyületek receptorkötődései azt mutatják, hogy a szelektivitást nagyobb-részt nem a gyűrűrendszerben található változtatások, hanem szintén a liotironin aminosav oldalláncának változtatása okozza [84, 85].

### Következtetések

Az obezitás kezelése egy folyamatosan és dinamikusan kutatott terület, hiszen a gyógyszergyártó cégek nagy bevételre számíthatnak egy-egy új készítmény piacra dobása után. Mint már említettük, az elhízás elsősorban nem esztétikai, hanem a kísérő betegségek, és súlyos szövődmények miatt egészségügyi probléma. A túlsúly és az elhízás világjárványnak tekinthető, a magyar lakosság kb. kétharmadát érinti ez a betegség. Azonban hangsúlyoznunk kell, az elhízás kezelésére nem a gyógyszeresedés az elsődleges megoldás. A legfontosabb a primer prevenció: az egészséges, mértékletes táplálkozás és a rendszeres mozgás. Nagyobb hangsúlyt kéne kapnia a szekunder prevenciónak, vagyis a szűrővizsgálatoknak is. Ebben szerepük lehet a gyógyszerárakban dolgozó gyógyszerészeknek, akik a gyógyszerészeti gondozás keretében továbbküldhetik az orvosokhoz a metabolikus szindrómára gyanús betegeket. A harmadik lépcső a betegség kezelése, és a rehabilitáció, ahol a súlyosabb esetekben szóba jöhet a gyógyszeres terápia. Ez azonban csak életmódváltással lehet hatékony; ne kergessünk olyan illúziókat, hogy bekapunk egy tablettát, és leolvadnak rólunk a felesleges kilók. Viszont a genetika is je-



lentősen befolyásolja a testalkat kialakulását. Genetikai hiba, pl. örökletes leptinhiány, Prader-Willi szindróma esetén csak gyógyszereléssel érhetünk el javulást.

Az utóbbi években kivonásra és bevezetésre is került több gyógyszer az obezitás kezelésére. Jelenleg a legtöbbet a kombinációs készítményektől, a centrális étvágy szabályozó és a gasztrointesztinális peptidekre ható szereként várhatunk. Sajnos a periférián ható szerek – orlisztát és cetilisztát – kivételével az esetleges súlyos mellékhatások fokozott figyelemre intenek, és korlátozzák a többi gyógyszer alkalmazását. A hatékonyságot tekintve a metreleptin és a pramlintid, vagy más leptin receptorokat érzékenyítő hatóanyag kombinációja tűnik biztatónak. A közeljövőben valószínűleg több új készítmény kerül a piacra.

### IRODALOM

- Horváth Z, Gilingerné Pankotai M, Szabolcs I: Magyar Orvos 16(11), 41-42 (2008).
- Simonyi G, Bedros JR: Az elhízás kezelésének szakmai és szervezeti irányelvei. A Magyar Obezitológiai és Mozgásterápiás Társaság állásfoglalása és ajánlása Cardiomatologica Hungarica 1, 1-38 (2008).
- Simonyi G, Pados G, Medvegy M, Bedros JR: Orv Hetil 153(10), 363-373 (2012).
- Kopelman PG: Nature 404(6778), 635-643 (2000).
- Colman E, Golden J, Roberts M, Egan A, Weaver J, Rosebraugh C: New Engl J Med 367(17), 1577-1579 (2012).
- Haslam David W, James W, Philip T: The Lancet 366, 1197-1209 (2005).
- Fonyó A.: Élettan gyógyszerészhallgatók részére. Medicina, Budapest, 2005. 400-412, 547-608 old.
- Murphy KG, Bloom SR: Nature 444(7121), 854-859 (2006).
- Dryden S, Pickavance L, Frankish HM, Williams G: Brain research 690(2), 185-188 (1995).
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD: Cell 88(1), 131-141 (1997).
- Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Tanaka T, Furuta M, Araki-Sasaki R, Hori Y, Nakatani K, Yano Y: J Clin Endocr Metab 86(5) 1921-1924 (2011).
- Marsh DJ, Weingarh DT, Novi DE, Chen HY, Trumbauer ME, Chen AS, Guan X-M, Jiang MM, Feng Y, Camacho RE: Proceedings of the National Academy of Sciences 99(5), 3240-3245 (2002).
- Luthin DR: Life sciences 81(6), 423-440 (2007).
- Langmead CJ, Jerman JC, Brough SJ, Scott C, Porter RA, Herdon HJ: Brit J Pharmacol 141 (2):340-346 (2004).
- Baxter CA, Cleator E, Brands KM, Edwards JS, Reamer RA, Sheen FJ, Stewart GW, Strotman NA, Wallace DJ: Org Process Res Dev 15(2), 367-375 (2011).
- Yu M, Fang P, Shi M, Zhu Y, Sun Y, Li Q, Bo P, Zhang Z: Peptides 44, 55-59 (2013).
- Bellochio L, Cervino C, Pasquali R, Pagotto U: J Neuroendocrinol 20(6), 850-857 (2008).
- Li M-F, Cheung BM: World journal of diabetes 2(2), 19 (2011).
- Emmerson PJ, Fisher MJ, Yan LZ, Mayer JP: Curr Top Med Chem 7(11), 1121-1130 (2007).
- Hunter RG, Philpot K, Vicentic A, Dominguez G, Hubert GW, Kuhar MJ: Trends Endocrin Met 15(9), 454-459 (2004).
- Richard D, Huang Q, Timofeeva E: Int J Obesity Rel Met Disorders 24, 36-39 (2000).
- Landa MS, Garcia SI, Schuman ML, Burgueño A, Alvarez AL, Saravia FE, Gemma C, Pirola CJ: Am J Physiol-Endoc M 292(5), 1388-1394 (2007).
- Wellman PJ: Nutrition 16 (10):837-842 (2000).
- Meguid MM, Fetissov SO, Varma M, Sato T, Zhang L, Laviano A, Rossi-Fanelli F: Nutrition 16(10), 843-857 (2000).
- Singh M: Front Psychol 5, 925 (2014).
- Appleyard SM, Hayward M, Young JJ, Butler AA, Cone RD, Rubinstein M, Low MJ: Endocrinol 144(5), 1753-1760 (2003).
- Martinez-Guisasola J, Guerrero M, Alonso F, Diaz F, Cordero J, Ferrer J: Gynecol Endocrinol 15(1), 14-22 (2001).
- Cancello R, Tounian A, Poitou C, Clement K: Diab Metabol 30(3), 215-227 (2004).
- Baskin DG, Lattemann DF, Seeley RJ, Woods SC, Porte D, Schwartz MW: Brain Res 848(1), 114-123 (1999).
- Jéquier E: Ann NY Acad Sci 967(1), 379-388 (2002).
- Wang B, Chandrasekera C, Pippin JJ: Curr Diab Rev 10(2), 131 (2014).
- Knight WD, Seth R, Boron J, Overton JM: Regul Peptides 154(1), 60-68 (2009).
- Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang M-Y, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH: Proceedings of the National Academy of Sciences 94(9), 4637-4641 (1997).
- Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hama-gami K-i, Matsuda K, Yamaguchi M, Tanabe H, Kimura-Someya T, Shirouzu M: Nature 503(7477), 493-499 (2013).
- Guillod-Maximin E, Roy A-F, Vacher C, Aubourg A, Bailleux V, Lorisignol A, Pénicaud L, Parquet M, Taouis M: J Endocrinol 200(1), 93-105 (2009).
- Fukuda S, Hirata A, Nishizawa H, Nagao H, Kashine S, Kimura T, Inoue K, Fujishima Y, Yamaoka M, Kozawa J: Cardiovasc Diabetol 14(1), 8 (2015).
- Antuna-Puente B, Feve B, Fellahi S, Bastard J-P: Diab Metabol 34(1), 2-11 (2008).
- Solmi M, Veronese N, Favaro A, Santonastaso P, Manzato E, Sergi G, Correll CU: Psychoneuroendocrinol 51, 237-252 (2015).
- Lazar M: Horm Met Res 39(10), 710-716 (2007).
- Owecki M, Miczke A, Nikisch E, Pupek-Musialik D, Sowiński J: Exp Clin Endocr Diab 119(2), 117-121 (2011).
- Adamska E, Ostrowska L, Gorska M, Kretowski A: Prz Gastroenterol 9(2), 69-76 (2014).
- Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo G, Cardillo C, Tesaro M: Int J Immunopathol Pharmacol 27(3), 433-436 (2014).
- Perelló M, Zigman JM: Biol Psychiat 72(5), 347-353 (2012).
- Nisal K, Kela R, Khunti K, Davies MJ: Comparison of efficacy between incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. BMC medicine 10(1), 152 (2012).
- Dietlein M, Kahaly G, Kobe C, Schmidt M, Derwahl K-M, Schicha H: Nuklearmedizin 47(5), 181-187 (2008).
- Toth G, Noszal B: Acta Pharm Hung 83(2), 35-45 (2012).
- Lazar MA: Endocr Rev 14(2), 184-193 (1993).
- Campfield LA, Smith FJ, Burn P: Science 280(5368), 1383-1387 (1998).
- Weigle DS: J Clin Endocrin Metab 88(6), 2462 (2003).
- Pados G: Orv Hetil 151(12), 501-504 (2010).
- Joo JK, Lee KS: J Menopausal Med 20(3), 90-96 (2014).
- Yanovski SZ, Yanovski JA: JAMA 311(1), 74-86 (2014).
- Derosa G, Maffioli P: Expert Opin Drug Saft 11(3), 459-471 (2012).



54. Kernan WN, Viscoli CM, Brass LM, Broderick JP, Brott T, Feldmann E, Morgenstern LB, Wilterdink JL, Horwitz RJ: *New Engl J Med* 343(25), 1826-1832 (2000).
55. Douglas IJ, Bhaskaran K, Batterham RL, Smeeth L: The Effectiveness of Pharmaceutical Interventions for Obesity: Weight Loss With Orlistat and Sibutramine in a United Kingdom Population-Based Cohort. *Brit J Clin Pharmacol* DOI: 10.1111/bcp.12578 (2014).
56. Proietto J, Rissanen A, Harp J, Erondy N, Yu Q, Suryawanshi S, Jones M, Johnson-Levonas A, Heymsfield S, Kaufman K: *Int J Obes* 34(8), 1243-1254 (2010).
57. Gras J: *Drugs Today (Barc)* 49(12), 755-759 (2013).
58. Higgins GA, Sellers EM, Fletcher PJ: *Trends Pharmacol Sci* 34(10), 560-570 (2013).
59. Thomsen WJ, Grottick AJ, Menzaghi F, Reyes-Saldana H, Espitia S, Yuskin D, Whelan K, Martin M, Morgan M, Chen W: *J Pharmacol Exp Ther* 325(2), 577-587 (2008).
60. Kim GW, Lin JE, Blomain ES, Waldman SA: *Clin Pharmacol Ther* 95(1), 53-66 (2014).
61. Ioannides-Demos LL, Piccenna L, McNeil JJ: *J Obesity Article ID 179674* (2010).
62. Kovács P, Kitka T, Misnyovszki M, Varga B, Farkas S, Horváth CM: Therapeutic combination of memantine and baclofen and pharmaceutical composition containing them. US Patent 20,140,316,007. (2014)
63. Garvey WT: *Exp Opin Drug Saf* 12(5), 741-756 (2013).
64. Jeon WS, Park C-Y: *Endocr Metab* 29(4), 410-417 (2014).
65. Caixàs A, Albert L, Capel I, Rigla M: Drug design, development and therapy 8, 1419 (2014).
66. Ornellas T, Chavez B: *Pharmacol Therapeut* 36(5), 255 (2011).
67. Aschenbrenner DS: *Am J Nurs* 115(4), 22-23 (2015).
68. Kelly AS, Metzjig AM, Rudser KD, Fitch AK, Fox CK, Nathan BM, Deering MM, Schwartz BL, Abuzzahab MJ, Gandrud LM: *Obesity* 20(2), 364-370 (2012).
69. Paz-Filho G, Mastronardi CA, Licinio J: *Metabolism* 64(1), 146-156 (2015).
70. Wabitsch M, Funcke J-B, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin K-M, Vatter P, Gierschik P, Moepps B, Fischer-Posovszky P: *New Engl J Med* 372(1), 48-54 (2015).
71. Mack C, Soares C, Wilson J, Athanacio J, Turek V, Trevaskis J, Roth J, Smith P, Gedulin B, Jodka C: *Int J Obes* 34(2), 385-395 (2010).
72. K Szalai K, Beke G, Éles J, Kitka T, Kovács P, Nagy J, Farkas S, Boros A: Recent Patents on Novel MCH1 Receptor Antagonists as Potential Anti-Obesity Drugs. Recent patents on CNS drug discovery 9(2), 122-140 (2014).
73. Cypess AM, Weiner LS, Roberts-Toler C, Elia EF, Kessler SH, Kahn PA, English J, Chatman K, Trauger SA, Doria A: *Cell Metabol* 21(1), 33-38 (2015).
74. Weyer C, Gautier J, Danforth Jr E: Development of beta 3-adrenoreceptor agonist for the treatment of obesity and diabetes – an update. *Diabetes Metab* 25(1), 11-21 (2008).
75. Ye L, Li YL, Mellstrom K, Mellin C, Bladh LG, Koehler K, Garg N, Garcia Collazo AM, Lihten C, Husman B, Persson K, Ljunggren J, Grover G, Sleph PG, George R, Malm J: *J Med Chem* 46(9), 1580-1588 (2003).
76. Hangeland JJ, Doweiko AM, Dejneca T, Friends TJ, Devasthale P, Mellstrom K, Sandberg J, Grynfarb M, Sack JS, Einspahr H, Farnegardh M, Husman B, Ljunggren J, Koehler K, Sheppard C, Malm J, Ryono DE: *Bioorg Med Chem Lett* 14(13), 3549-3553 (2004).
77. Toth G, Baska F, Schretner A, Racz A, Noszal B: *Eur Biophys J* 42(9), 721-730 (2013).
78. Grover GJ, Mellstrom K, Malm J: *Cardiovasc Drug Rev* 23(2), 133-148 (2005).
79. Baxter JD, Webb P, Grover G, Scanlan TS: *Trends Endocrin Metab* 15(4), 154-157 (2004).
80. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS: *Endocrinology* 141(9), 3057-3064 (2000).
81. Sweetlove M: *Pharmaceutical Medicine* 26(3), 185-187 (2012).
82. de Araujo AS, Martinez L, de Paula Nicoluci R, Skaf MS, Polikarpov I: Structural modeling of high-affinity thyroid receptor-ligand complexes. *Eur Biophys J* 39(11), 1523-1536 (2010).
83. Haning H, Woltering M, Mueller U, Schmidt G, Schmeck C, Voehringer V, Kretschmer A, Pernerstorfer J: *Bioorg Med Chem Lett* 15(7), 1835-1840 (2005).
84. Taub R, Chiang E, Chabot-Blanchet M, Kelly MJ, Reeves RA, Guertin M-C, Tardif J-C: *Atherosclerosis* 230(2), 373-380 (2013).
85. Kelly MJ, Pietranico-Cole S, Larigan JD, Haynes N-E, Reynolds CH, Scott N, Vermeulen J, Dvorozniak M, Conde-Knape K, Huang K-S: *J Med Chem* 57(10), 3912-3923 (2014).

Érkezett: 2015. április 10.



## Nazális gyógyszerformák permeabilitási vizsgálata Side-Bi-Side™ horizontális cella alkalmazásával

HORVÁTH TAMÁS<sup>1,2</sup>, AMBRUS RITA<sup>1</sup> ÉS SZABÓNÉ RÉVÉSZ PIROSKA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszertechnológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

<sup>2</sup>Goodwill Pharma Kft., Szeged, Cserzy Mihály u. 32. – 6724

\*Kapcsolattartó email címe: revesz@pharm.u-szeged.hu

### Summary

HORVÁTH, T., AMBRUS, R., SZABÓ-RÉVÉSZ, P.\*: *Investigation of permeability of intranasal formulations using Side-Bi-Side™ horizontal diffusion cell*

Nowadays the nasal route has received a great attention as a reliable administration for the systemic administration. In the Department of Pharmaceutical Technology, University of Szeged, the main research work is the design and development of innovative nasal formulations, which can open new possibilities for some well-known agents and may also help some drug-candidates delivery problems. The aim of this work was to present some reliable models for investigation of permeability, such as Spectra/Por Dialysis Membran, ZelluTrans/Roth Mini Dialyzer,  $\mu$ FLUX™ diffusion Cell, Navicte Vertical and Horizontal Diffusion Chamber System and In-line Cell. In addition, the horizontal membrane diffusion model (Side-Bi-Side™) was used to investigate in vitro and ex vivo studies of permeability of meloxicam in comparison with the vertical diffusion cell (Franz). The present study investigated the meloxicam in different dosage forms (powder, spray, gel). It was found that the Side-Bi-Side™ cell is suitable to test the nasal formulations, but the uniform distribution of the active substance cannot be ensured in donor place by increasing the viscosity of the compositions, therefore the Franz cell is recommended for investigation of nasal gel.

Previous measurement cannot be found related to this topic.

**Keywords:** nasal forms, permeability, Side-Bi-Side™ diffusion cell, meloxicam

### Összefoglalás

Az orr, mint alternatív beviteli kapu, egyre fontosabb szerepet tölt be a hatóanyagok szisztémás keringésbe történő juttatására. Az SZTE Gyógyszertechnológiai Intézetben folyó nazális kutatások fő célja olyan innovatív nazális gyógyszerformák tervezése és fejlesztése, ami jól ismert hatóanyagoknak új beviteli kaput nyithat meg és bizonyos farmakon-jelöltek bejuttatási problémáit is megoldhatja. A munka célkitűzése a jelenleg meghatározó permeabilitási modellek bemutatása (Spectra/Por dialízis membrán, ZelluTrans/Roth dializáló,  $\mu$ FLUX™ diffúziós cella, Navicte Vertikális és Horizontális Diffúziós Cella, In-line diffúziós cella) és egy horizontális membrán-diffúziós modell tesztelése (Side-Bi-Side™) volt, ami in vitro és ex vivo vizsgálatok végzésére alkalmas. A összehasonlítás alapja egy vertikális diffúziós cella (Franz) volt. Munkánk során a meloxicám diffúzióját hasonlítottuk össze különböző gyógyszerformákban (por, spray, gél). Megállapítottuk, hogy az általunk tesztelt Side-Bi-Side™ cella alkalmas a nazális gyógyszerformák vizsgálatára, de a vizsgálandó készítmény viszkozitásának növelésével a hatóanyag egyenletes eloszlása a donor fázisban nem biztosítható, így a készülékkel a gél formák vizsgálata nehézségekbe ütközik. Ez esetben a Franz-cella alkalmazása javasolt. A bemutatott módszerek korábban még nem kerültek összehasonlításra nazális permeabilitás vizsgálat szempontjából.

**Kulcsszavak:** nazális gyógyszerformák, permeabilitás, Side-Bi-Side™ diffúziós cella, meloxicám

### Bevezető

Az elmúlt évtizedekben kerültek ismét előtérbe a nazális gyógyszerformák, tekintve széles alkalmazási lehetőségüket. Az orr, szisztémás hatás elérése céljából, mint alternatív beviteli kapu alkalmas hatóanyagok bevitelére, emellett helyi- és közvetlenül centrális idegrendszeri hatások kiváltására is.

Az intranazális gyógyszerbevitel az ornyálkahártya gyors abszorpciók képességének köszönhetően az intravénás alkalmazás egyik alternatívája lehet. Azáltal, hogy egy nem-invazív módszerről van szó, a készítmény előállítás költséget csökkenti az aszeptikus gyártás mellőzése. Könnyű és

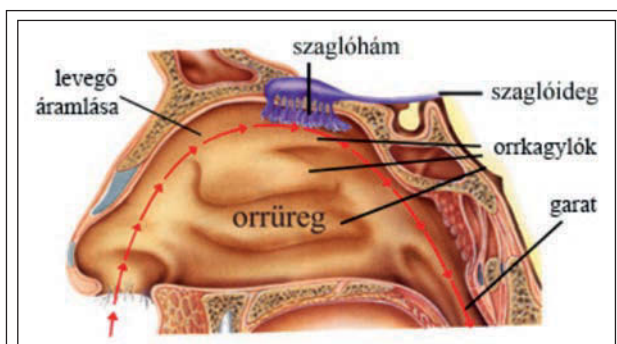
egyszerű alkalmazása növeli a beteg együttműködését (compliance-t), ami a terápia hatékonyságát növeli. A legtöbb ma forgalomba hozott nazális gyógyszer helyi hatású készítmény (például: allergiás rhinitis kezelése), emellett azonban szisztémás hatás kiváltásával több területen is alkalmazható (például: fájdalomcsillapítás, erektilis diszfunkció). Ilyen készítmény például a Glaxo-SmithKline által gyártott Imigran® oldatos orrspray, amely szumatriptán hatóanyagával migrénes rohamok csillapítására alkalmas. Az orrnyálkahártyájának nagy felülete és sűrű vérellátottsága általi gyors abszorpció következtében krízishelyzetekben is kihasználható. Emellett felme-

rül az orron keresztüli immunizálás lehetősége is. A nazális beviteli kapu egyik legfontosabb jelentősége, hogy közvetlenül a szaglóidegen keresztül is bejuthatnak pl. nagy molekulatömegű hatóanyagok a központi idegrendszerbe, kikerülve a vér-ágy gátat.

Az orrüreg legfelső területén speciális szaglóhám (*regio olfactoria*) van, amely a 150 cm<sup>2</sup> összfelület alig 10%-át képezi [1]. Nazális gyógyszerbevitel szempontjából ez a terület bír a legnagyobb jelentőséggel (1. ábra). Az orrüregben a csillós hengerhám egyik legfontosabb funkciója a mukózan található idegen anyagok (pl. por, szennyeződés, gyógyszerek) eltávolítása az orrnyílás és a garat irányába. Szabályos irányú és megfelelő frekvenciájú (kb. 300 csapás/perc) mozgásuk miatt az orrnyálkahártya 10-15 perc alatt teljesen megújul és eliminálódik minden idegen anyag az orrüregből [2]. Ennek a jelenségnek a neve *mukociliáris clearance* (MCC). Hatóanyag bejuttatása szempontjából az egyik legnagyobb kihívást ennek a védelmi funkciónak a lassítása, vagy ideiglenes kikapcsolása jelenti, irreverzibilis károsodás nélkül. Több patológias állapot (pl. megfázás) is jelentős hatással van erre a funkcióra, de egyéb tényező is befolyásolja: kor, a nem, egészségi állapot és az orrüregben uralkodó hőmérséklet (24°C fok az ideális) [3]. Az orrnyálkahártyán keresztüli permeabilitást befolyásolja az orrszekrétum viszkozitása és a farmakon oldódása a szekrétumban is, mivel egy 5 µm vastagságú alul szol, felül gél állapotú réteg borítja az epitél sejteket. A fizikai-kémia paraméterek egyik fontos paramétere a permeabilitás, amely a biohasznosulás mértékét jelzi előre. Permeabilitás mérésére több módszert fejlesztettek ki, amelyekből ma már fejlesztési protokollokat dolgoztak ki. Jelentős az enzimek által okozott degradáció, amely elsősorban proteinek és hormonok bejuttatásánál akadályozza a felszívódást.

A nazális készítmények fejlesztésénél alkalmazott eljárás részletezése később kerül bemutatásra a cikkben.

A nazális nyálkahártyán a hatóanyagok elsősorban transzcellulárisan és paracellulárisan jutnak át. A lipofil farmakonok a sejten keresztül transzcellulárisan, hidrophil hatóanyagok a sejtek között, paracellulárisan képesek átjutni. A sejtek közötti szoros kapcsolatok („tight junction”) mérete kb. 10 Å, emiatt 1 kDa-nál nagyobb méretű anyagok átjutása fordítottan arányos a molekula tömegével. Ennek következtében a poláris anyagok felszívódása kis molekulatömegű anyagoknál



1. ábra: Az orrüreg felépítése [4]

kismértékű (<10%), proteineknel és hormonoknál (pl.: inzulin, kalcitonin) pedig elhanyagolható (<1%) [5-8]. Összességében elmondható, hogy három fő okra vezethető vissza a farmakonok rossz intranazális transzportja: *kis permeabilitás, jelentős clearance és az enzim által okozott degradáció.*

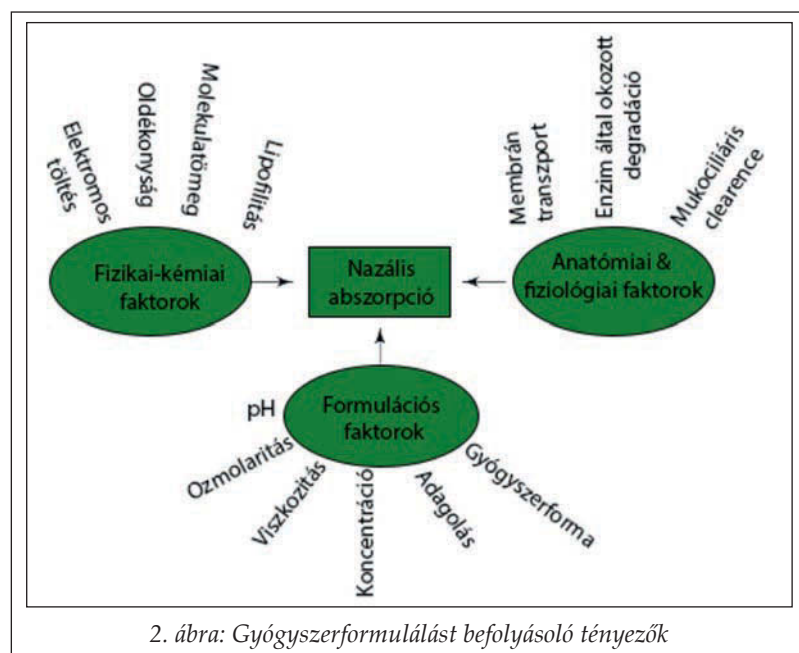
A jelenleg hatályos VIII. Magyar Gyógyszerkönyv a nazális gyógyszerformákat az alábbi csoportokra osztja: orrcseppek, orrporok, félszilárd nazális készítmények, orröblítők, gyógyszeres pácikák. Ezeknél a gyógyszerformáknál előírt kötelezően elvégzendő vizsgálatok közé tartozik: az adagolás egységességének, a tömeg egységességének és a hatóanyag tartalom egységességének mérése.

Jelen közleményben összefoglaljuk az intranazális készítmények formulálásának szempontjait, a gyógyszerforma fejlesztésének protokoll lépéseit, illetve a permeabilitás vizsgálatok módszereit, s azok alkalmazhatóságát hasonlítjuk össze. A kísérleti részben egy horizontális diffúzió vizsgálatra használható eszköz (Side-Bi-Side™) alkalmazhatóságát szemléltetjük nazális formák tesztelése céljából. Célul tűztük ki intranazális permeabilitás vizsgálatok elvégzését, *in vitro* hatóanyag diffúzióját vizsgáló Side-Bi-Side™ készülék tesztelését és alkalmassá tételét nazális formák (por, spray, gél) hatóanyagának diffúziós vizsgálatára, az eljárási paraméterek optimalizálásával (hőmérséklet, mintavétel változtatása, előkészítés az *ex vivo* vizsgálatokra).

### Gyógyszerformulálási szempontok

A formulálás szempontjából befolyásoló tényező a farmakon molekulatömege, a molekula mérete, a hatóanyag oldékonysága, lipofilitása, megoszlási koefficiense és pKa értéke (2. ábra). A már említett „tight junction-ok” fizikai akadályt jelentenek különböző *molekulatömegű anyagoknál*. A hatóanyag bevitele és az olfaktórius régióhoz való jutása





szempontjából meghatározó a részecske/csepp mérete. Nazális bevitel céljából a megfelelő szemcseméret az 5-40  $\mu\text{m}$ -es mérettartomány [9-11]. Mindemmel jelentős formulálási paraméter a kémhatás, amely természetes körülményeknél: átlagosan 4,5-6,5 között van (felnőtt: pH=5,5-6,5, gyerek: pH=5,0-7,0). A kémhatás nem megfelelő kiválasztása rontja a beteg compliance-t is, mivel irritációt, rossz érzést kelt a betegben. Az optimális hatóanyag koncentráció és ozmolaritás kiválasztásával az orrnyálkahártya sérülése kerülhető el, mivel a koncentráció emelése nem jelent nagyobb mértékű felszívódást. Általában 100  $\mu\text{l}$  használatos, mivel a nagyobb mennyiség kifolyik az orrnyíláson vagy a garat felé csorog. Nagyobb térfogat bejuttatására az egyik megoldás a viszkozitás növelése, például gél forma alkalmazása lehet. A régi összetételek mellett fontos megemlíteni a modern hatóanyag-hordozó rendszereket úgy, mint a mikro-, nanokristályok, liposzómák, nioszómák, amelyek hagyományos úton bejuttathatóak az orrba (oldatos és szuszpenziós spray-k, orrcseppek, orrporok, emulziók és nazális gélek).

Nazális gyógyszerformák fejlesztésénél a fizikai és kémiai tényezőket figyelembe véve elmondható, hogy az optimális gyógyszerforma legyen kis mennyiségű (25-200  $\mu\text{l}$ ), az orrnyálkahártyán a farmakon gyorsan szívódjon fel (10-15 perc), ne irritáljon, egyszerűen és pontosan lehessen alkalmazni.

A betegek compliance-t tekintve az oldatos és szuszpenziós spray formák preferáltak, mivel könnyen és pontosan lehet adagolni. A gél forma

előnye, hogy hosszabb ideig tartózkodik a nyálkahártyán és kisebb mértékű a kifolyás is. Azonban használat során „idegen test” érzését kelti, ami nagymértékben rontja használatát. A por formák alkalmazásának előnye, hogy a legtöbb hatóanyag nazális felszívódása javítható ezzel a gyógyszerformával, miközben az orrnyálkahártyán való felszívódáshoz kevesebb idő szükséges, mint például egy spray-nél.

Nazális gyógyszerforma fejlesztésénél egyre fontosabb szerepe van az abszorpciófokozó segédanyagoknak, ezen belül is a mikroszférák formulálásánál alkalmazható segédanyagok használatának elterjedése figyelhető meg az utóbbi évtizedben [12-14]. Legkedveltebbek a keményítő tartal-

mú mikroszférák (például lebomló keményítő mikroszféra), de emellett dextránt, kitozánt és más pozitív töltésű polimert is alkalmaznak. Széles körben alkalmaznak ciklodextrineket [15-17], foszfolipideket és lipideket, illetve epesókat (pl. nátrium-dezoxikolat), amelyek jelentősen növelik az abszorpciót, nem toxikusak és kevésbé irritálnak [18-23].

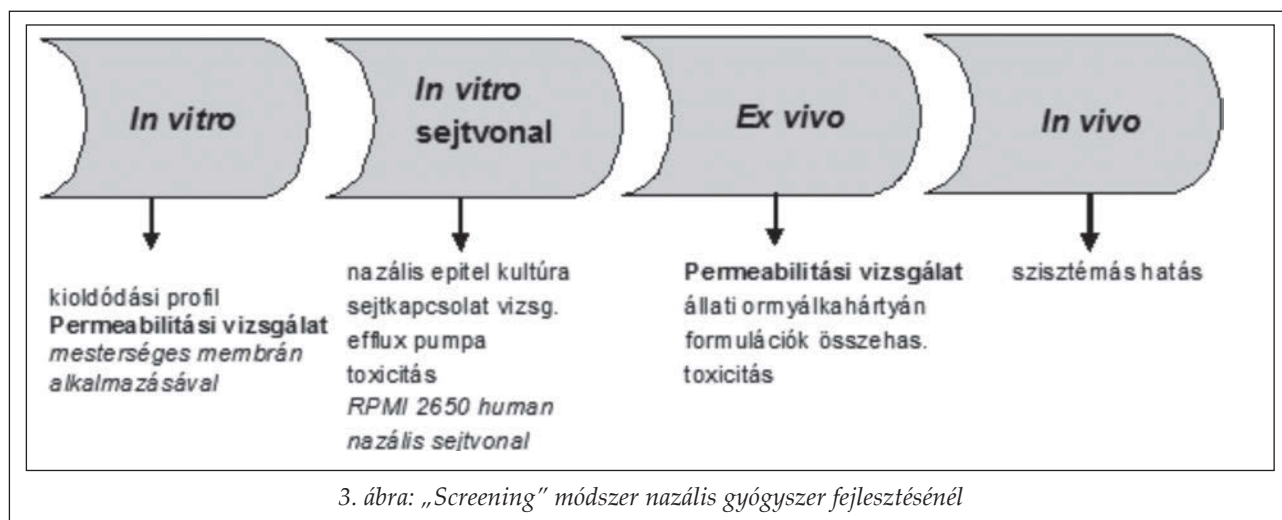
Az intranazális gyógyszerbevitelnél használt fontosabb segédanyagok a következők:

- szolubilizáló szerek: poliszorbát, cukor-észterek,
- ko-szolvensek: etanol, propilén-glikol, ciklodextrinek,
- gélképző, viszkozitás növelők: metilcellulóz, polivinil alkohol,
- permeabilitást fokozók:  $\alpha$ - és  $\beta$ -ciklodextrinek, Cremophor RH 40,
- mukoadhezív anyag: nátrium-hialuronát, kitozán,
- illat- és ízjavító: mentol,
- enzim inhibitorok, pufferek: foszfátok.

### Nazális gyógyszerforma fejlesztési protokoll

A költség- és időtakarékoság miatt ma már léteznek olyan „screening” módszerek (3. ábra), amelyek viszonylag kevés számú kísérlettel is elég nagy valószínűséggel előre tudják jelezni egy-egy farmakon, vagy készítmény alkalmazhatóságát, ami a humán klinikai vizsgálatok rizikóját csökkenti és hatékonyságát növeli. Az SZTE Gyógyszertechnológiai Intézetben folyó nazális kutatások is e protokoll alapján zajlanak [24]. Első lépés-





ként *in vitro* vizsgáljuk a hatóanyag oldékonyságát, kioldódási profilját és permeabilitását mesterséges membránon. Ha a hatóanyag megfelelt a formulálási szempontoknak, akkor *in vitro sejtvonalas* vizsgálatokat következnek, ami során tesztelhető a formulált készítmény toxicitását és megfigyelhető a sejtek reakciója [25]. Ugyanez a vizsgálat alkalmas egyes még nazálisan nem vagy kevésbé alkalmazott segédanyagok toxicitásának ellenőrzésére is. Nazális készítményeknél RPMI 2650 human nazális epitel sejteket használnak elsősorban [26-28]. Ez a nazális epitel kultúra alkalmas a hatóanyag permeabilitásának előjelzésére is. A fejlesztés későbbi lépéseiben további információ nyerhető az *ex vivo vizsgálatokkal*, vagyis élő szöveten végzett permeabilitási és toxicitási vizsgálatokkal. A későbbiekben pedig *in vivo*, állatkísérletekben tanulmányozható a készítmény élő szervezetre kifejtett hatása.

Az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok közötti kapcsolatot a mesterséges membránon és állati nyálkahártyán végzett kísérletek képezik. Ezen vizsgálatok elvégzésére az utóbbi évtizedekben számos olyan modellt fejlesztettek ki, amelyek a hatóanyagok permeabilitásának vizsgálatára alkalmasak. A következőkben a jelenleg használható diffúziós modelleket mutatjuk be, kiemelve a Side-Bi-Side™ diffúziós cellát, amellyel saját nazális gyógyszerformáinkat is vizsgáljuk.

### Permeabilitást vizsgáló módszerek

*Spectra/Por dialízis membrán*  
*(Spectra/Por 1 - 5, 6 & 7 Dialysis Membran)*

A Spectra/Por diffúziós készülékkel hatóanyagok permeabilitását vizsgálják, de emellett transz-

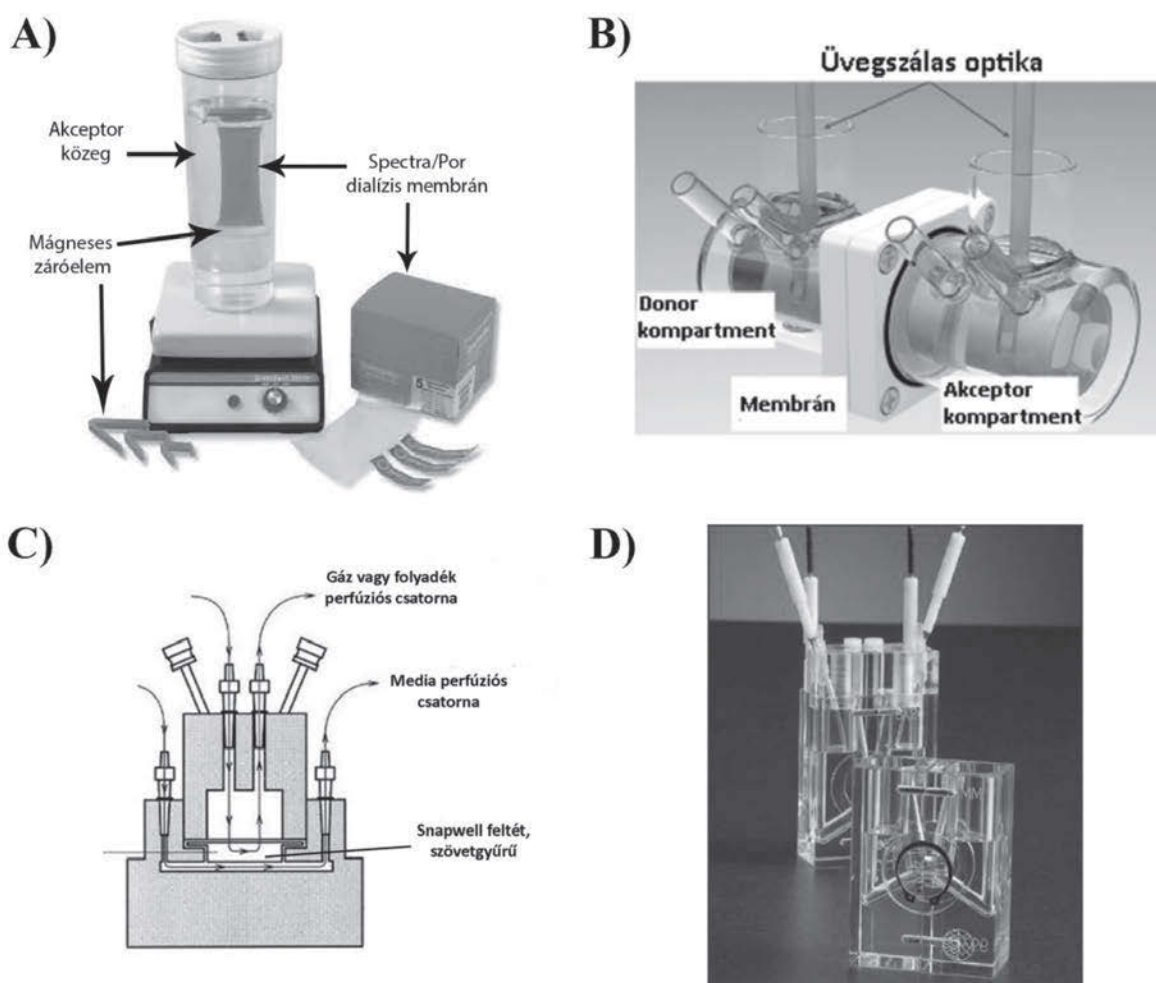
dermális gélek vizsgálatára is alkalmazzák [29-30]. Az amerikai Spectrum Laboratories, Inc. által gyártott eszköz gyapotból készült (4/A. ábra), természetes cellulózból álló dializáló membránból (amely a felhasználáshoz szükséges méretre vágható) és egy-egy, mindkét végét biztonságosan lezáró 4-10 mm széles záróelemből áll. A diffúzió bármilyen duplafalú edényben elvégezhető (pl. Franz-cellában), amely automata mintavevő készülékkel összekapcsolható. A membrán alkalmas felületaktív anyagok, proteinek, sejt kultúrák vizsgálatára pH 2-12 között. Az RC (Biotech Regenerated Cellulose) változat ellenállóbb, így szerves anyagokhoz használható, míg a CE változat (Biotech Cellulose Ester) nagy szelektivitású, amellyel többféle molekulaméretű anyag vizsgálható pl. 100 és 1 000 000 Da közötti.

*ZelluTras/Roth dializáló (ZelluTrans/Roth Mini Dialyzer)*

Az európai (Carl Roth GmbH, Németország) fejlesztésű ZelluTrans mini dializálót kifejezetten protein, peptid tartalmú, vizes közegű oldatok, emulziók permeabilitási vizsgálatához alkalmazzák. Emellett használják sejt kultúrák és enzimaktivitás méréséhez is. A ZelluTrans alacsony kötőképességű cellulózból álló kompartmentje legfeljebb 100 µl vizsgálatára alkalmas, pH 3-10-es kémhatású környezetben, legfeljebb 24 óráig.

*µFLUX™ diffúziós cella - in situ UV monitorozó optikai rendszer abszorpció vizsgálatához*

A közelmúltban jelent meg a µFLUX™ horizontális diffúziós cella (Pion Inc., USA) hatóanyagok permeabilitási vizsgálatához. A modell az alap ki-



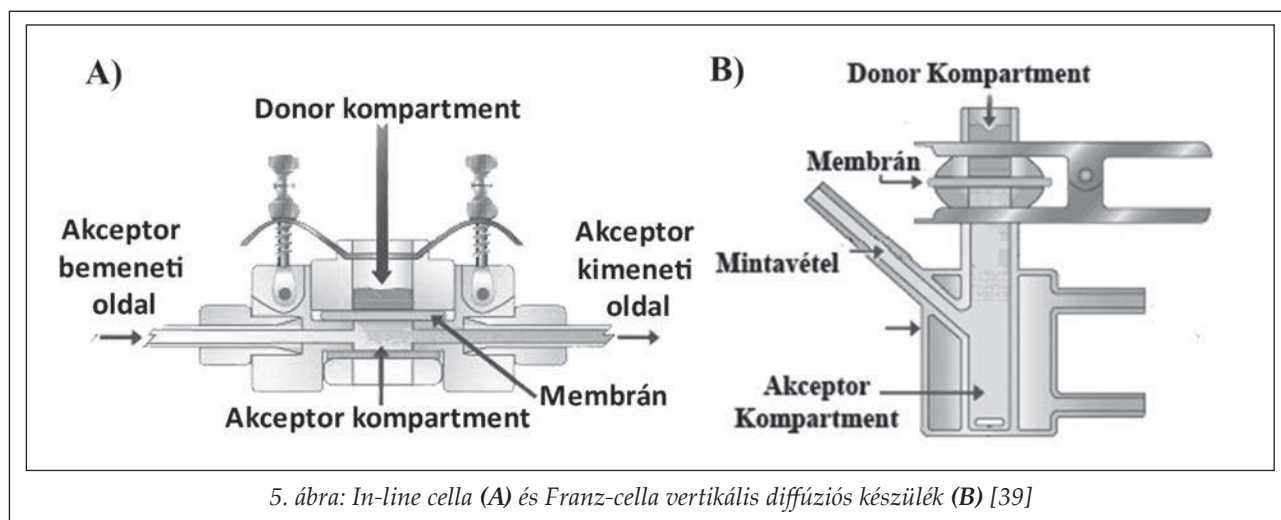
4. ábra: Diffúziós készülékek sematikus ábrái: Spectra/Por dialízis membrán (A),  $\mu$ FLUX<sup>TM</sup> diffúziós cella (B), Navicyte Vertikális (C) és Horizontális (D) diffúziós cellák

oldódó készülék tartozékaiként egy donor és egy akceptor kompartmentből áll, amelyeket mesterséges membrán választ el (4/B. ábra). A kompartmentekbe 10-13 ml folyadék tölthető, amelyekbe egy üvegszál optikával UV detektor telepíthető, ezzel valós-idejű koncentráció mérés válik lehetővé mindkét oldalon. A horizontális elrendezésű diffúziós készülék kis mennyiségű minta mérésére alkalmas, amely előnyös új hatóanyag tulajdonságainak meghatározásához vagy rossz vízoldékonyságú hatóanyagok kioldódási vizsgálatára [31-32]. Mivel új mérési módszerről van szó, így eddig nazális készítmények fejlesztésénél még nem alkalmazták.

*Navicyte Vertikális Diffúziós Cella (Navicyte Vertical Ussing Diffusion Chamber System)*

A Navicyte Vertikális Diffúziós Cella (Harvard

Apparatus, USA) egyaránt alkalmas sejtvonalak és *ex vivo* szövetek vizsgálatára (4/C. ábra). A rendszer hat darab diffúziós cellából áll, amelyeket egy fűtőegység temperál. A vertikális cellának két változata van: az egyikhez a Snapwell<sup>TM</sup> sejtkultúrás feltét illeszthető, a másikat *ex vivo* szövetek vizsgálatához használják. Utóbbiak elérhetőek kerek és oblong formában a könnyebb használhatóság érdekében: a GI eredetű szövetekhez kapcsolódó oblong alakú kompartment képes megnövelni az effektív felületet. Alkalmazható kis térfogatú változata, amellyel így a hatóanyag-igény csökkenthető. A diffúziós cellákhoz elektrodák is csatlakoztathatóak, amelyekkel mindkét kompartmentben mérhető az elektromos potenciál és az elektromos ellenállás. Az eszközt intesztinális permeabilitás mérésére alkalmazzák, emellett nazális beviteli forma vizsgálatára is vannak adatok az irodalomban [33-34].



5. ábra: In-line cella (A) és Franz-cella vertikális diffúziós készülék (B) [39]

#### Navicyte Horizontális Diffúziós Cella (Navicyte Horizontal Diffusion Chamber System)

A Navicyte Horizontális Diffúziós Cella rendszert (Harvard Apparatus, USA) olyan szövetek transzport folyamatainak tanulmányozására és toxikológia méréseire alkalmazzák, amik levegővel érintkeznek természetes körülmények között is (például nazális, pulmonális és dermális szövetek). A kompartmentben létrejött környezetben a szövet apikális oldala folyadékkal, félszilárd formával vagy gázzal érintkezik, míg a bazolaterális oldal a mediummal (4/D. ábra). A horizontális cella rendszer hasonlóan a vertikális készülékhez hat egységből áll, amelyhez Snapwell™ feltét vagy úgynevezett „Tissue Mounting Rings” csatlakoztatható. A cellák fűtéegységgel temperálhatóak, a felső, apikális oldali diffúziós kompartment kétféle kialakítású lehet, alkalmazásától függően: nyitott vagy zárt. A tapasztalatok azt mutatják, hogy nyitott kompartment használata előnyösebb folyadék és félszilárd rendszerek vizsgálatakor. Zárt rendszernél különböző gázokat vagy gáznyomás mellett folyadékokat lehet vizsgálni steril környezetben is. A kamrákba elektródot helyezve a két kompartment elektromos ellenállása válik mérhetővé. A Vertikális diffúziós cellához hasonlóan nazális és a GI-traktus hatóanyag-felszívódását imitálják az eszközzel.

#### Snapwell™ Cell Culture Insert

A két részből álló eszközt a Vertikális és Horizontális Diffúziós Cellával együtt használják, ezáltal különböző körülmények imitálhatóak. A behelyezhető feltét egy 12 mm átmérőjű, 0,4 mikrométer pórusméretű membrán, ami egy eltávolítható

gyűrűben helyezkedik el. A feltéttel vizsgáltak már humán tüdőszöveten, illetve Caco-2 sejtvonalon is mintákat [35-36].

#### In-line diffúziós cella (In-line Cell)

A PermeGear, USA által gyártott In-Line diffúziós cellát elsősorban gyógyszerformák fejlesztésére használják, amely 3-15 mm közötti átmérőjű donor kompartmenttel szerelhető fel. Az In-Line cella egyedi szorítóval rendelkezik, amellyel gyors és biztonságos rögzítés érhető el. A 5/A. ábrán oldalnézetből látható a diffúziós készülék felépítése, amely HPLC-hez csatlakoztatható. Az In-Line cella leginkább egy vertikális diffúziós cella, nagy térfogatú (100 ml-es) donor kamrával és diffúziós felülettel (12,56 cm<sup>2</sup>). Az In-Line cellában a membrán horizontális helyzetben van, amely felett a donor kompartment nyitott felülről, bár az utóbbi időben megjelentek zárt donorkamrás változatok is. Transzdermális és transzbukkális diffúziós mérésekre vonatkozóan található irodalmi adat [37-38]. Vertikális felépítése következtében az orron keresztüli permeabilitás modellezése nehézségekbe ütközik.

#### Franz-cella vertikális diffúziós készülék (Franz vertical diffusion cell)

A Hanson Research Company (USA) által gyártott Franz-cella egy vertikális, két kompartmentből álló készülék, amely donor és akceptor fázisból áll [40]. A két kompartment között található egy szemi-permeabilis membrán. A modellt elsősorban transzdermális gyógyszerformák vizsgálatára, gélek és krémek vizsgálatához használják [7, 41-44]. Az 5/B. ábrán látható a készülék sematikus felépítése, ahol megfigyelhető, hogy a kis térfogatú donor fázis (300 µl)

I. táblázat

A Side-Bi-Side™ cella és a Franz-cella közötti legfontosabb különbségek

	Side-Bi-Side™ cella (Crown Glass, USA)	Franz cella (Hanson Research Co., USA)
Akceptor-donor elhelyezkedése	horizontális	vertikális
Membránfelület nagysága	0,69 cm <sup>2</sup>	1,8 cm <sup>2</sup>
Donor rész térfogata	3 ml	7 ml
Akceptor rész térfogata	3 ml	0,3 ml
Minta bevitel helye	Donor kompartmentbe	Közvetlenül a membránra

II. táblázat

Különböző meloxicám tartalmú gyógyszerformák összetételei

Jelölés	MEL (mg)	HA (mg)	Előállított gyógyszerforma
MEL por	3	-	por
MEL spray	3	3	viszkózus folyékony spray forma
MEL gél	3	15	gél

alatt helyezkedik el a nagyobb térfogatú akceptor fázis (7 ml), amelyben – ellentétben az akceptor kompartmenttel – mágneses keverővel biztosítható a hatóanyag egyenletes eloszlása. Többféle akceptor térfogatot és különböző donor feltétet fejlesztettek a vizsgálati célnak megfelelően: csavarkupakos feltét, speciális körömvizsgáló feltét, iontoforézis próba végzésére alkalmas feltét, optikai szálalás feltét, amellyel valós-idejű hatóanyag-detektálás végezhető el. A gyógyszerfejlesztésben elterjedt módszer a diffúzió vizsgálatára alkalmas, ám kevésbé modellezi az orrban uralkodó viszonyokat.

#### Side-Bi-Side™ horizontális diffúziós készülék

A Side-Bi-Side™ (Crown Glass, USA) nevű horizontális típusú diffúziós vizsgáló készüléket többek között vér-agy gát és nazális kutatások során lehet alkalmazni [45-46]. A Side-Bi-Side™ készüléknél a két kompartment horizontális helyzetben

van (6. ábra). Mind a donor, mind az akceptor fázis 3-3 ml térfogatú, a kevertetés mágneses keverő segítségével mindkét oldalon lehetséges, így egy-egyes hatóanyag-eloszlás biztosítható. Alkalmas kis térfogatú por vagy híg makromolekulás oldatok vizsgálatára. A módszer alkalmas farmakon-jelöltek diffúziós vizsgálatára is, ahol kis mennyiségű anyag áll rendelkezésre.

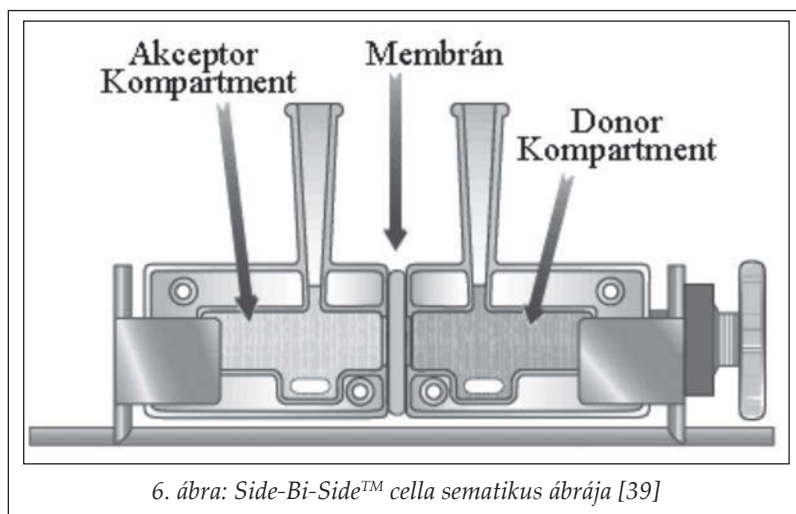
A készüléknek több változatát is kifejlesztették, így lehetőség van elektródát helyezni mindkét kompartmentbe, ezzel valós-idejű elektromos vezetés, illetve ellenállás mérésére. A Valia-Chien Cell kialakítással cornea membrán vizsgálható a szem kerek felületét imitálva a készülékben.

A legfontosabb különbség, hogy míg a Franz-cellánál vertikális irányú a donor és akceptor cella helyzete, így a diffúzió iránya, addig a Side-Bi-Side™ készüléknél a két kompartment horizontális helyzetben van (I. táblázat). A mintabevitel a horizontális cellánál a donor kompartmentbe történik, míg a vertikális cellánál közvetlenül a membránra szükséges a mintát adagolni. A Franz-cellát általában lágy formák fejlesztésénél alkalmazzák, míg a Side-Bi-Side™ cellát oldatos formák és folyadékban eloszlott (szuszpendált) hatóanyagok diffúziós vizsgálatánál.

#### Kísérletes munka

##### Anyagok

Kísérleti munkánk során hatóanyagként meloxicámot (MEL) (Egis Gyógyszergyár, Budapest), a gyógyszerfor-



6. ábra: Side-Bi-Side™ cella sematikus ábrája [39]



ma kialakításához 14.000 kDa molekulatömegű nátrium-hialuronátot (HA) (Richter G. Nyrt., Budapest) és 5,6 pH-jú foszfát-puffert (PBS) használtunk fel. A MEL átlagos szemcsemérete 35,27  $\mu\text{m}$ .

#### Minták előállítása

A spray forma kialakításánál 1 tömegrész HA, míg a gélnél 5 tömegrész HA hozzáadásával alakítottuk ki a megfelelő viszkozitású gyógyszerformát (*II. táblázat*). A 3,0 mg kimért hatóanyag mennyiségéhez 15 ml PBS-t adtunk, majd végül a HA-t a folyadék tetejére jutattuk az időigényes hidratálódás miatt. A készítményt egy éjszakára hűtőben tároltuk és a vizsgálatok előtt 20 percig homogenizáltuk.

#### A vizsgálati körülmények beállítása Side-Bi-Side™ készülék esetében

A kísérleti mérések elkezdésének egyik feltétele a Side-Bi-Side™ készülék beállítása és az eljárási paraméterek optimalizálása volt, amely magába foglalta többek között a hőmérséklet (25°C és 37°C), a mintavétel változtatását (individuális mérés, aliquot vétel). A készülék két kompartmentjének térfogat azonosságát mágneses csiszolatrögzítővel biztosítottuk, amely a két cella között a membrán rögzítését tette lehetővé. A módosítással az eszközt alkalmassá tettük az *ex vivo* vizsgálatokra is. A spray és gél forma készülékbe juttatása nem okozott problémát, szemben a por gyógyszerformával.

A vizsgálati paraméterek beállítása szobahőmérsékleten történt, majd azt követően a hőmérsékletet 37°C-ra temperáltuk (Thermo Haake C10-P5, Sigma, Aldrich Co.), ezzel modellezve az emberi vérkeringés hőmérsékletét. Vizsgálataink során a donor kompartment kémhatása pH=5,6, az akceptor fázisé 7,4 volt. A mérések során 25 mm átmérőjű, 45  $\mu\text{m}$ -es pórusú cellulóz-észterből készült mesterséges membránt használtunk (GN-6 Metricel® MCE Membrane Filter), amelyet a mérés előtt 20 percig izopropil-mirisztáthba beáztattuk. A por formánál 3,0 mg tömegű port mértünk be, a spray és gél formánál 3 ml térfogatú terméket használtunk fel (hatóanyagra vonatkoztatott koncentrációja 1 mg/ml). A mintavételek a kevertetés 5., 10., 15. és 60. percében történtek, a mágneses kevertetés sebessége 100 rpm volt. Az

átdiffundált hatóanyag-mennyiséget spektrofotométerrel (ATI Unicam UV/VIS Spectrometer UV2, Egyesült Királyság) határoztuk meg, 364 nm-en.

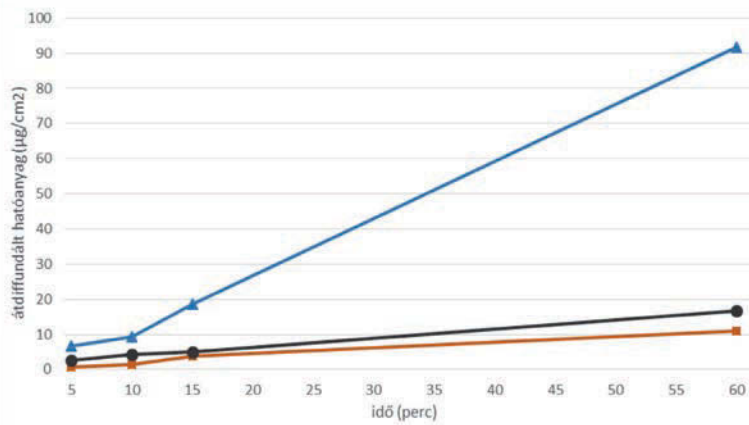
#### Minták bejuttatása a donor fázisba

A minta előkészítése és veszteség nélküli bejuttatása a donor fázisba a MEL gél és a MEL spray formánál pipettával történt, míg por forma már több kihívással járt. Az elővizsgálatok során a nazális por bevitelére különböző módszereket dolgoztunk ki, több hatóanyagot is alapul véve. A por formánál az analitikai mérlegen kimért 3 mg tömegű hatóanyagot különböző módon jutattuk a készülékbe. Tapasztalataink azt mutatták, hogy a tölcseren keresztüli közvetlen bemosás és a főzőpohárban történő előzetes szuszpendálás mind jelentős anyagvesztéssel járnak. Így a vizsgált nazális porok speciális csónak segítségével történő bemosása járt a legkisebb anyagvesztéssel. A mintavétel módjával történő vizsgálat (*7. ábra*) eredménye azt mutatta, hogy míg az elővizsgálatoknál a teljes mennyiséget levettük és minden mintavételhez külön mértük be a készítményt, addig az összehasonlító vizsgálatoknál injekciós tűvel aliquot vétel (2 ml) történt.

Tehát nazális por, mint szilárd gyógyszerforma vizsgálatánál a „csónak” alkalmazása bizonyult a legmegfelelőbbnek (MEL – közvetlen) (91,67  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), így a későbbiek során is ezt a beviteli módot alkalmaztuk.

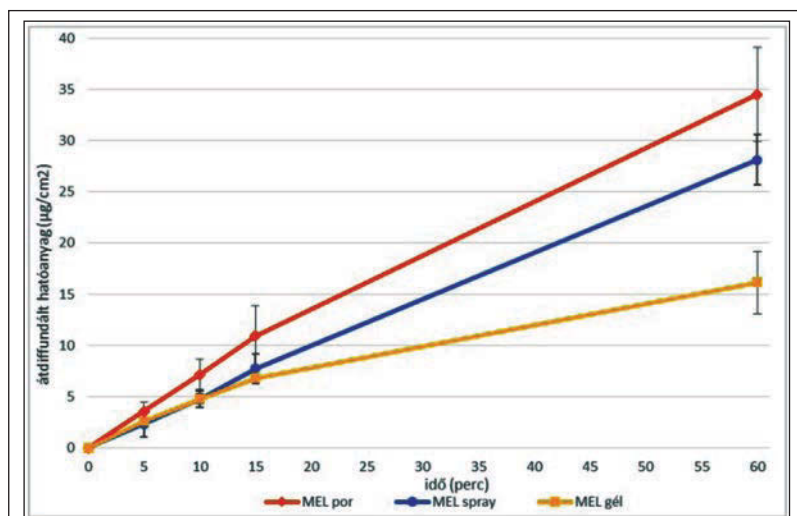
#### Nazális gyógyszerformák vizsgálata Side-Bi-Side™ horizontális diffúziós készülékkel

A horizontális cellán végzett előkísérletek eredménye alapján a különböző nazális formák vizs-



7. ábra: Meloxicám diffúziója nazális porból különböző minta beviteli módoknál





8. ábra: Nazális gyógyszerformák diffúziójának összehasonlítása Side-Bi-Side<sup>TM</sup> cellán

gálatával folytatódott a kísérletes munka (8. ábra). A három gyógyszerforma közül a por formának a legnagyobb a diffúziója ( $94,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) a horizontális készülékben és a viszkozitás növelésével csökken a diffúzió mértéke (por>spray>gél). A jelenség a hatóanyag nem egyenletes eloszlásával magyarázható, mivel a nagy viszkozitású gélnél a mágneses keverő nem működik elég hatékonyan a donor fázisban. A diagramról leolvasható, hogy a nazális szempontból fontos 1-15 perc időintervallum után még jelenetős a diffúzió a két kompartment között.

### Összefoglalás

Összegzésként elmondható, hogy cikkünk irodalmi áttekintése összefoglalót ad az orron keresztüli gyógyszerbevitelről a gyógyszerformák csoportosításáról és alkalmazásának lehetőségeiről általánosságban, elsősorban szisztémás hatás kiváltása céljából.

Bemutatásra kerültek a manapság alkalmazott diffúziós modellek permeabilitás vizsgálata céljából. A tárgyalt diffúziós cellák egy részét transzdermális gyógyszerformák vizsgálatára is alkalmazzák (Franz-cella, In-line diffúziós cella és Spectra/Por dialízis membrán). Kifejezetten kioldódás vizsgálatára peptidek, fehérjék esetén a ZelluTras/Roth dializáló, a rossz vízoldékonyságú hatóanyagoknál pedig a  $\mu\text{FLUX}^{\text{TM}}$  cellát alkalmazzák. Nazális gyógyszerforma fejlesztésére elsősorban a Navicyte Horizontális és Vertikális Diffúziós Cella illetve a Side-Bi-Side<sup>TM</sup> cella alkalmas.

Kísérletekkel bizonyítottuk, hogy a Side-Bi-Side<sup>TM</sup> horizontális cella alkalmas nazális készit-

mények hatóanyagának diffúziós vizsgálatára is: jól reprodukálható eredményeket ad, kis szórással; egyszerű a minta előkészítése és a mintavétel; a készülék könnyen összeszerelhető, tisztítása egyszerű.

Különböző nazális gyógyszerforma (por, spray, gél) összehasonlító diffúziós vizsgálatának eredményeként megállapítható, hogy a Side-Bi-Side<sup>TM</sup> modell elsősorban orrporok és orrspray-k – ez utóbbi esetében különösen a szuszpenziós rendszerek – vizsgálatára javasolható. Előnyt jelent a donor fázis keverése a szuszpendált hatóanyag eloszlása szempontjából. Gél forma esetében a készülékkel nem biztosítható a gél egyenletes el-

oszlása a donor fázisban, így ilyen esetben a más cellával végzett vizsgálat javasolható. Meg kell jegyezni, hogy a nazális por egyre nagyobb jelentőséggel bír, így a diffúziós vizsgálatok jelentősége is egyre fontosabb, mivel ezzel a gyógyszerformával kiküszöbölhetőek egyes hatóanyagok stabilitási problémái.

### IRODALOM

1. Illum, L.: Eur. J. Pharm. Sci. 11, 1–18 (2000).
2. Marttin, E., Schipper, N.G M., Coos Verhoef, J., Merkus, F.W.H M: Adv. Drug Delivery Rev. 29, 13–38 (1998).
3. Mossberg, B., Afzelius, B., Camner, P.: Eur. J. Respir. Dis. Suppl. 146, 295–301 (1986).
4. [http://cms.sulinet.hu/get/d/1c37f73e-3ace-4f29-8edf-792e6ab6ba41/1/6/b/Normal/10\\_erzek02.jpg](http://cms.sulinet.hu/get/d/1c37f73e-3ace-4f29-8edf-792e6ab6ba41/1/6/b/Normal/10_erzek02.jpg) [2014.12.04]
5. Donovan, M.D., Huang, Y.: Adv. Drug Delivery Rev. 29, 147–155 (1998).
6. Sipos, E., Kurunczi, A., Fehér, A., Penke, Z., Fülöp, L., Kasza, Á., Horváth, J., Horvát, S., Veszelka, S., Balogh, G., Kürti, L., Erős, I., Szabó-Révész P., Párducz, Á., Penke, B., Deli, M.A.: Cell. Mol. Neurobiol. 30, 405–413 (2010).
7. Pund, S., Rasve, G., Borade, G.: Eur. J. Pharm. Sci. 48, 195–201 (2013).
8. Veeniga, J.G., Berend, O.: Neurosci. Biobehav. Rev. 37, 1445–1465 (2013).
9. Sente, V., Zelkó, R.: Acta Pharm. Hung. 78, 87–90 (2008).
10. Canadian Pat. CA 2275554 (1999)
11. Illum, L., Farraj, N., Critchley, H., Davis, S.: Int. J. Pharm. 46, 261–265 (1988).
12. Holmberg, K., Bjork, E., Bake, B., Edman, P.: Rhinology 31, 74–77 (1992).
13. Edman, P., Bjork, E., Ryden, L.: J. Control. Release 21, 165–172 (1992).

14. Merkus, F.W.H M., Schipper, N.G M., Hermens, W.A.J.J., Romeijn, S.G., Verhoef, J.C.: *J. Control. Release* 24, 201–208 (1993).
15. Zhang, X., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Z., Niu, H., Li, C.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 526–534 (2008).
16. Alpar, H.O., Somavarapu, S., Atuah, K.N., Bramwell, V.W.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 57, 411–430 (2005).
17. Agua, R.U., Dangb, H. Vu, Jorissen, M., Kinget, R., Verbeke, N.: *Peptides* 25, 563–569 (2004).
18. De Boer, A.G.: *Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibility, Limitations and Trends.* Harwood Academic Publishers, Singapore, 119–153 (1994).
19. Morimoto, K., Miyazaki, M., Kakemi, M.: *Int. J. Pharm.* 113, 1–8 (1995).
20. Dondeti, P., Zia, H., Needham, T.E.: *Int. J. Pharm.* 127, 115–133 (1996).
21. Horvát, S., Fehér, A., Wolburg, H., Sipos, P., Veszeka, S., Tóth, A., Kis, L., Kurunczi, A., Balogh, G., Kürti, L., Erős, I., Szabó-Révész, P., Deli, M. A.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 252–259 (2009).
22. Türker, S., Onur, E., Özer, Y.: *Pharm. World Sci.* 26, 137–142 (2004).
23. Hinchcliffe, M., Illum, L.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 35, 199–234 (1999).
24. Kürti, L., Gáspár, R., Márki, Á., Kápolna, E., Bocsik, A., Veszeka, Sz., Bartos, Cs., Ambrus, R., Vastag, M., Deli, M.A., Szabó-Révész, P.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 50, 86–92 (2013).
25. Abdelbary, G.A., Tadros, M.I.: *Int. J. Pharm.* 452, 300–310 (2013).
26. Wengst, A., Reichl, S.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74, 290–297 (2010).
27. Kürti L., Veszeka Sz., Bocsik A., Ózsvári B., Puskás L.G., Kittel Á., Szabó-Révész P., Deli M.A.: *Cyto-technology* 65, 395–406 (2013).
28. Kürti, L., Veszeka, Sz., Bocsik, A., Khue Dung, N.T., Ózsvári, B., Puskás, L.G., Kittel, Á., Szabó-Révész, P., Deli, M.A.: *Toxicol. In Vitro* 26, 445–454 (2012).
29. Muller, J., Abdelouas, A., Ribet, S., Grambow, B.: *Applied Geochemistry* 27, 2524–2532 (2002).
30. Parsaei, S., Sarboloukia, M.N., Parnianpourb, M.: *Int. J. Pharm.* 241, 185–190 (2002).
31. Avdeef, A., Tsinman, O.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 28, 43–59 (2006).
32. Fagerberg, JH., Tsinman, O., Sun, N., Tsinman, K., Avdeef, A., Bergström, C.A.: *Mol. Pharm.* 7, 1419–1430 (2010).
33. Söderholm, J. D., Hedman, L., Artursson, P., Franzeén, L., Larsson, J., Pantzar, N., Permert, J., Olaison, G.: *Acta Physiol. Scand.* 162, 47–56 (1998).
34. Liuqin, H., Yulong, Y., Tiejun, L., Rulin, H., Mingyong, X., Zhenlong, W., Guoyao, W.: *Frontiers in Bioscience* 18, 1266–1274 (2013).
35. Galletta, L. J. V., Folli, C., Marchetti, C., Romano, L., Carpani, D., Conese, M., Zegarar-Moran, O.: *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, 1186–1194 (2000).
36. S. Schaar, R. Schubert, I. Hänel, M. Leiterer, G. Jahreis.: *Instrum. Sci. Technol.* 32, 6 (2004).
37. Córdoba-Díaz, M., Nova, M., Elorza, B., Córdoba-Díaz, D., Chantres, J.R., Córdoba-Borrego, M.: *J. Controlled Release* 69, 357–367 (2000).
38. Jun, X., Xiaoling, F., Xiaoling, L.: *Int. J. Pharm.* 231, 57–66 (2002).
39. PermeGear Inc.: [www.permegear.com](http://www.permegear.com) (2013.02.01)
40. Franz, T.J.: *J. Invest. Dermatol.* 64, 190–195 (1975).
41. Shiow-Fern, Ng., Rouse, J.J., Sanderson, F.D., Meidan, V., Eccleston, G. M.: *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 11, 1432–1441 (2010).
42. Gummer, C.L., Hinz, R.S., Maibach, H.I.: *Int. J. Pharm.* 40, 101–104 (1987).
43. Leitnera, V.M., Guggia, D., Kraulanda, A.H., Bernkop-Schngrch, A.: *J. Controlled Release* 100, 87–95 (2004).
44. Russo, P., Stigliani, M., Prota, L., Auriemma, G., Crescenzi, C., Porta, A., Aquino, R.P.: *Int. J. Pharm.* 440, 250–255 (2013).
45. Brownson E.A., Abbruscato T.J., Gillespie T.J., V Hruby. J., Davis T.P.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207, 675–680 (1994).
46. Schmidt, M.C., Simmen, D., Hilbe, M., Boderke, P., Ditzinger, G., Sandow, J., Lang, S., Rubas, W., Merkle, H.P.: *J. Pharm. Sci.*, 89, 396–407 (2000).

Érkezett: 2015. február 16.

## Diarylheptanoidok előfordulása a mogoró nemzetség Kárpát-medencében honos fajaiban

RIETHMÜLLER ESZTER<sup>A,B\*</sup>, TÓTH GERGŐ<sup>C</sup>, ALBERTI ÁGNES<sup>B</sup>, VÉGH KRISZTINA<sup>B</sup>,  
BÉNI SZABOLCS<sup>B</sup>, BALOGH GYÖRGY TIBOR<sup>A</sup>, KÉRY ÁGNES<sup>B</sup>

<sup>A</sup>Szintézistámogató Laboratórium, Richter Gedeon Nyrt., 1103 Budapest, Gyömrői út 32-34.

<sup>B</sup>Farmakognóziai Intézet, Semmelweis Egyetem, 1085 Budapest, Üllői út 26.

<sup>C</sup>Gyógyszerészeti Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem, 1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

\*Levelező szerző

e-mail: eszter.riethmuller@gmail.com

Cím: Richter Gedeon Nyrt. KKI

Szintézistámogató Laboratórium

1103 Budapest, Gyömrői út 32-34.

### Summary

RIETHMÜLLER, E., TÓTH, G., ALBERTI, Á., VÉGH, K., BÉNI, SZ., BALOGH, GY.T., KÉRY, Á.: **Occurrence of diarylheptanoids in *Corylus* species native to Hungary**

Since the last decade naturally occurring diarylheptanoids have been in the focus of scientific interest due to their various beneficial biological effects. Besides the outstanding importance of the curcuminoids isolated from members of the *Curcuma* genus (*Zingiberaceae*), several different diarylheptanoids identified in *Alnus* species (*Betulaceae*) have been proved to possess notable pharmacological effects. Chemoprotective, neuroprotective, hepatoprotective, antiviral, antibacterial, antiinflammatory and antioxidant activities suggest their potential role in clinical practice.

The aim of our study was the phytochemical investigation of the *Corylus* (*Betulaceae*) species native to Hungary: the Common hazel (*Corylus avellana* L.), the Turkish hazel (*Corylus colurna* L.) and the Filbert (*Corylus maxima* Mill.) in order to characterise their phenolic-profile. Although these plants have been used in the traditional medicine for long time, literature data considering their phytochemical composition is limited to the flavonoid and hydroxycinnamic-acid derivatives of *C. avellana* leaves. No previous studies have been published reporting the presence of diarylheptanoid compounds in any of the *Corylus* species.

Soxhlet extraction with solvents of increasing polarity was performed on the bark and leaves of the mentioned three *Corylus* species. The phenolic-profile of the methanolic and ethyl acetate extracts was investigated by HPLC-DAD-ESI-TOF-MS and HPLC-DAD-ESI-MS/MS methods. Altogether 37 different phenolic compounds were detected in the extracts: twenty diarylheptanoids (**1-20**), nine flavonols (**21-29**) and eight other phenolics: caffeic and quinic acid derivatives and flavanones (**30-37**). The main compounds of the extracts were identified as myricetin- quercetin- and kaempferol-3-O-rhamnosides.

**Keywords:** *Corylus*, hazel, diarylheptanoid, flavonoid, HPLC-MS

### Összefoglalás

Az utóbbi évtizedben kedvező biológiai hatásaiaknak köszönhetően a diarylheptanoid szerkezetű, növényi eredetű fenoloidok a tudományos érdeklődés előterébe kerültek. A kiemelkedő jelentőségű *Curcuma* genus (*Zingiberaceae*) mellett a *Betulaceae* családba tartozó *Alnus* nemzetség több képviselőjében igazolták e vegyületek jelenlétét, melyek nagy szerkezeti variabilitást, valamint jelentős és változatos biológiai aktivitást mutattak. Bizonyították többek között kemoprotektív, neuroprotektív, szelektív citotoxikus, májvédő, antivirális, antibakteriális, gyulladásgátló és antioxidáns hatásukat. Célul tűztük ki ezért a *Betulaceae* család *Corylus* nemzetségének Kárpát-medencében fellelhető fajai, a közönséges mogoró (*Corylus avellana* L.), a török mogoró (*Corylus colurna* L.) és a csöves mogoró (*Corylus maxima* Mill.) fitokémiai vizsgálatát fenoloid profiljuk jellemzése céljából. E növényeket a tradicionális gyógyászatban hosszú ideje alkalmazzák, irodalmi adat azonban csak a közönséges mogoró levelének fenoloid összetételéről állt rendelkezésre, mely nem tett említést diarylheptanoidok jelenlétéről.

Az említett fajok kéreg- és levéldrogaiból metanollal és etilacetáttal készült Soxhlet kivonatok fenoloid profilját HPLC-DAD-ESI-TOF-MS és HPLC-DAD-ESI-MS/MS módszerekkel vizsgáltuk. Összesen 37 különböző fenoloid komponenszt detektáltunk a kivonatokban, köztük húsz diarylheptanoidot (**1-20**), kilenc flavonol-származékot (**21-29**), valamint nyolc egyéb polifenol komponenszt, kávésav-, kinasav-származékokat, illetve flavanonokat (**30-37**). Az extraktumok fő komponenseit miricetin-, quercetin- és kaempferol-3-O-rhamnosidokként azonosítottuk. Bizonyítottuk, hogy az egyes mogorófajok kiváló forrásai természetes antioxidáns hatású diarylheptán és flavonoid-származékoknak.

**Kulcsszavak:** *Corylus*, mogoró, diarylheptanoid, flavonoid, HPLC, MS.

## Bevezetés

A gyógynövényekben rejlő terápiás lehetőségek évszázadok óta ismertek az emberiség számára, ezek jelentős része azonban a mai napig kiaknázatlan. A modern gyógynövénykutatás célpontjai legtöbb esetben olyan növények, melyek bár a tradicionális gyógyászatban hosszú ideje felhasználást nyernek, azonban hatóanyagaik, azok farmakológiai sajátosságai nem ismertek. Emellett fontos szerep jut a kedvező biológiai hatással rendelkező növényi eredetű vegyületek szerkezeti analógiáinak feltárását célzó taxonómiai alapú szűrővizsgálatoknak.

A növényi kivonatok komponenseinek szerkezetazonosítása, mennyiségi meghatározása a növényi mátrix komplexitásából adódóan kihívást jelentő analitikai feladat. Ehhez megfelelő eszközt nyújthat a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával (HPLC) kapcsolt tömegspektrometria (MS). A tömegspektrométer kiemelkedő érzékenysége és szelektivitása lehetővé teszi a minor komponensek detektálását, mennyiségi analízisét is, emellett szerkezetükről is releváns információt nyújt. A repülési idő analízátorral (TOF) rendelkező MS detektor segítségével a vegyületek pontos tömegét felhasználva azok elemi összetétele meghatározható, míg a hármass kvadrupól (QqQ) tömegspektrométerben történő fragmentáció egyéb szerkezeti tulajdonságokról ad információt [1].

Az utóbbi évtizedben kedvező biológiai hatásai miatt köszönhetően a diarilheptanoid szerkezetű, növényi eredetű fenoloidok a tudományos érdeklődés előterébe kerültek. A kiemelkedő jelentőségű *Curcuma* genus (Zingiberaceae) mellett a Betulaceae családba tartozó *Alnus* nemzetség több képviselőjében igazolták e vegyületek jelenlétét, melyek nagy szerkezeti variabilitást, valamint jelentős és változatos biológiai aktivitást mutattak. Bizonyították többek között kemoprotektív, neuroprotektív, szelektív citotoxikus, májvédő, antivirális, antibakteriális, gyulladásgátló, antioxidáns hatásukat [2].

A fent említett ígéretes eredmények tükrében a diarilheptanoid szerkezetű fenoloidok kutatása időszerű, a Betulaceae család tagjaiban való előfordulásuk vizsgálata indokolt. Célul tűztük ki ezért a Betulaceae család *Corylus* nemzetségének Kárpát-medencében fellelhető fajai, a közönséges mogyoró (*Corlyus avellana* L.), a török mogyoró (*Corylus colurna* L.) és a csöves mogyoró (*Corylus maxima* Mill.) fitokémiai vizsgálatát fenoloid profiljuk jellemzése céljából. E növényeket a tradicio-

nális gyógyászatban hosszú ideje alkalmazzák, szakirodalmi adat azonban csak a közönséges mogyoró levelének fenoloid összetételéről áll rendelkezésre [3], mely nem tett említést diarilheptanoidok jelenlétéről.

## Anyagok és módszerek

### Növéyminta

A levél és kéreg minták begyűjtésére az alábbi helyszíneken és időpontokban került sor (50-50 gramm, három egyedről, virágzást követő stádiumban): *Corylus avellana* L.: Nógrád, 2011. augusztus, *Corylus colurna* L.: Göd 2012. szeptember, *Corylus maxima* Mill.: Pálfi-szeg 2013. augusztus. A növények azonosítása a Semmelweis Egyetem Farmakognóziai Intézetében történt.

### Oldószerek és reagensek

A hirsutenon, oregonin, miricetin-3-O-ramnozid, kvercetin-3-O-ramnozid, rozmaringsav, kvercetin, kempferol, aszkorbinsav és kávéssav referencia-vegyületeket, a DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) és ABTS {2,2'-azino-bisz-(3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav)} szabadgyököket, a kálium-peroxodiszulfátot és a HPLC minőségű metanolt a Sigma-Aldrich Kft.-től (St. Louis, USA), a HPLC minőségű acetonitrilt a Merck Kft.-től (Darmstadt, Németország), a reagens minőségű *n*-hexánt, kloroformot, etil-acetátot, ecetsavat, metanolt, és a spektroszkópiás minőségű etanolt a Reanal-Ker Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A HPLC minőségű desztillált vizet Millipore Direct Q5 (Bedford, MA, USA) víztisztító rendszerrel állítottuk elő. Minden vizes HPLC eluenst közvetlenül felhasználás előtt MF-Millipore membránszűrőkön (0.45 µm, kevert cellulóz észterek) (Billerica, MA, USA) szűrtünk, majd ultrahangos fürdőben gáztalanítottunk.

### Extrakció és mintaelőkészítés

10-10 g levél-, illetve kéregmintából Soxhlet készülékben készítettünk kivonatokat egymást követő extrakcióval 250-250 ml *n*-hexánt, majd kloroformot használva 6-6 órán át, 60°C-on, ezt követően etil-acetátot, végül metanolt alkalmazva szintén 6-6 órán keresztül, 90°C-on. A kivonatokat rotációs vákuumdesztillálóban 50°C-on szárazra pároltuk, HPLC minőségű metanolban (3-4 ml) oldottuk, majd Phenex-RC 15 mm, 20 µm fecskendő-



szűrőn (Gen-Lab Ltd, Budapest, Magyarország) szűrtük.

#### *Antioxidáns aktivitás vizsgálatok*

A *Corylus* kivonatok és a referencia-vegyületek antioxidáns aktivitását DPPH és ABTS szabadgyököket tartalmazó *in vitro* tesztekben határoztuk meg [4-6]. A törzsoldatokat 10,00 mg DPPH 25,0 ml HPLC minőségű metanolban, valamint 10,00 mg ABTS 2,6 ml HPLC minőségű desztillált vízben történő oldásával készítettük. Az ABTS törzsoldathoz 1,72 mg kálium-peroxodiszulfátot adtunk. A törzsoldatokat közvetlenül mérés előtt úgy hígítottuk HPLC metanollal, illetve spektroszkópiás minőségű etanollal, hogy azok abszorbanciája 0,900 ( $\pm 0,005$ ) legyen. A mérés során a vizsgálandó minták öt különböző koncentrációjú oldatának 50-50  $\mu$ l-ét adagoltuk a szabadgyök törzsoldatok 2,5 ml-éhez (három párhuzamos mérést végeztünk). Az abszorbancia csökkenésének mértékét 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 és 360 másodperc elteltével regisztráltuk. A méréseket Hitachi U-2000 spektrofotométerrel végeztük (Hitachi Ltd., Tokio, Japán) 515 nm-en (DPPH) és 734 nm-en (ABTS). A 360 másodperc elteltével mért abszorbanciákat a legegyszerűbb reakció kinetikai modell segítségével extrapoláltuk. A minták antioxidáns aktivitását  $IC_{50}$  értékekkel fejeztük ki.

#### *HPLC-DAD-QMS körülmények*

Készülék: Agilent 6120 kvadrupól tömegspektrométer elektropray (ESI) ionforrással (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) Agilent 1100 HPLC rendszerhez kapcsolva (G1379A degasser, G1311A kvaterner pumpa, G1367B automata mintaadagoló, G1316A oszlop termosztát és G1315B diódasoros detektor). A *Corylus* minták kromatográfiás elválasztását 40°C-ra termosztált Kinetex-XB C18 oszlopon (15 cm  $\times$  4,6 mm, 2,6  $\mu$ m; Phenomenex, Torrance, CA, USA) végeztük 10  $\mu$ l-es injektálási térfogattal. A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk 0,5 ml/perces áramlási sebesség mellett, ahol az A eluens 0,2 %-os (v/v) ecetsav, a B eluens acetonitril volt: 0 perc 0% B, 5 perc 5% B, 15 perc 10% B, 30 perc 20% B, 60 perc 50% B, 70 perc 100% B. A kromatogramokat 254, 280 és 350 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat a 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

A tömegspektrometriás körülmények a következők voltak: ionforrás: ESI, negatív ion mód, a

szárító gáz ( $N_2$ ) hőmérséklete 350 °C, áramlási sebessége 12 l/perc, a porlasztó gáz ( $N_2$ ) nyomása 10 psi, fragmentor feszültség 120 V, kapilláris feszültség 4000V.

#### *HPLC-DAD-TOF-MS körülmények*

Készülék: Agilent 6230 repülési idő (time-of-flight, TOF) tömegspektrométer Jet Stream elektropray ionforrással (ESI) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) Agilent 1260 Infinity HPLC rendszerhez kapcsolva (G1312B bináris pumpa, G1367E automata mintaadagoló, G1315C diódasoros detektor) (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország). Az adatok feldolgozása Agilent MassHunter B.03.01 szoftverrel történt.

A *Corylus* minták kromatográfiás elválasztását 25°C-ra termosztált Zorbax SB C18 oszlopon (150  $\times$  3,0 mm, 3,5  $\mu$ m; Agilent Technologies, Waldbronn, Németország) végeztük, 10  $\mu$ l-es injektálási térfogattal. A következő gradiens elúciós programot alkalmaztuk 0,3 ml/perces áramlási sebesség mellett, ahol az A eluens 0,2 %-os (v/v) ecetsav, a B eluens metanol volt: 0 perc: 30 % (v/v) B, 20 perc: 100 % (v/v) B 22 perc: 100 % (v/v) B 23 perc: 30 % (v/v) B. A kromatogramokat 254, 290 és 350 nm-en regisztráltuk, az UV spektrumokat 200 és 400 nm közti tartományban vettük fel.

A tömegspektrometriás körülmények a következők voltak: ionforrás: ESI, negatív ion mód, a szárító gáz ( $N_2$ ) hőmérséklete 325°C, áramlási sebessége 10,0 l/perc, a porlasztó gáz ( $N_2$ ) nyomása 10 psi, a köpeny gáz áramlási sebessége 7,5 l/perc, hőmérséklete 325°C, fragmentor feszültség 170 V, kapilláris feszültség 4000V. A tömegspektrumokat a 100-2500-as  $m/z$  tartományban vettük fel. Az analízisek során  $m/z$  112,9855 és 1033,9881 referencia tömegeket használtunk a kalibrációhoz.

#### *HPLC-DAD-QqQ MS körülmények*

Készülék: Agilent 6410 hármas kvadrupól (QqQ) tömegspektrométer elektropray ionforrással (ESI) (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) Agilent 1100 HPLC rendszerhez kapcsolva (G1312A bináris pumpa, G1329A automata mintaadagoló, G1315C diódasoros detektor) (Agilent Technologies, Waldbronn, Németország). A kromatográfiás elválasztás körülményei megegyeztek a HPLC-DAD-TOF-MS analízisek során alkalmazottakkal. Az adatok feldolgozása a MassHunter B.01.03 szoftverrel történt.

A tömegspektrometriás körülmények a követ-

kezők voltak: ionforrás: ESI, negatív ion mód, a szárító gáz ( $N_2$ ) hőmérséklete  $350^\circ C$ , áramlási sebessége 9 l/perc, a porlasztó gáz ( $N_2$ ) nyomása 40 psi, fragmentor feszültség 120 V, kapilláris feszültség 3500 V. A tömegspektrumokat a 50-1000-es  $m/z$  tartományban vettük fel. Az ütközési energiát 10–50 eV között változtattunk különböző szerkezetű vegyületek esetén (ütköztető gázként nagy-tisztaságú nitrogént alkalmaztunk).

A vegyületek azonosítása céljából két különböző kromatográfiás rendszerben mért retenciós idejüket, UV- és tömegspektrumukat, valamint pontos tömegüket autentikus referencia-vegyületek vonatkozó értékeivel, illetve ezek hiányában irodalmi adatokkal vetettük össze [7-10].

## Eredmények és diszkusszió

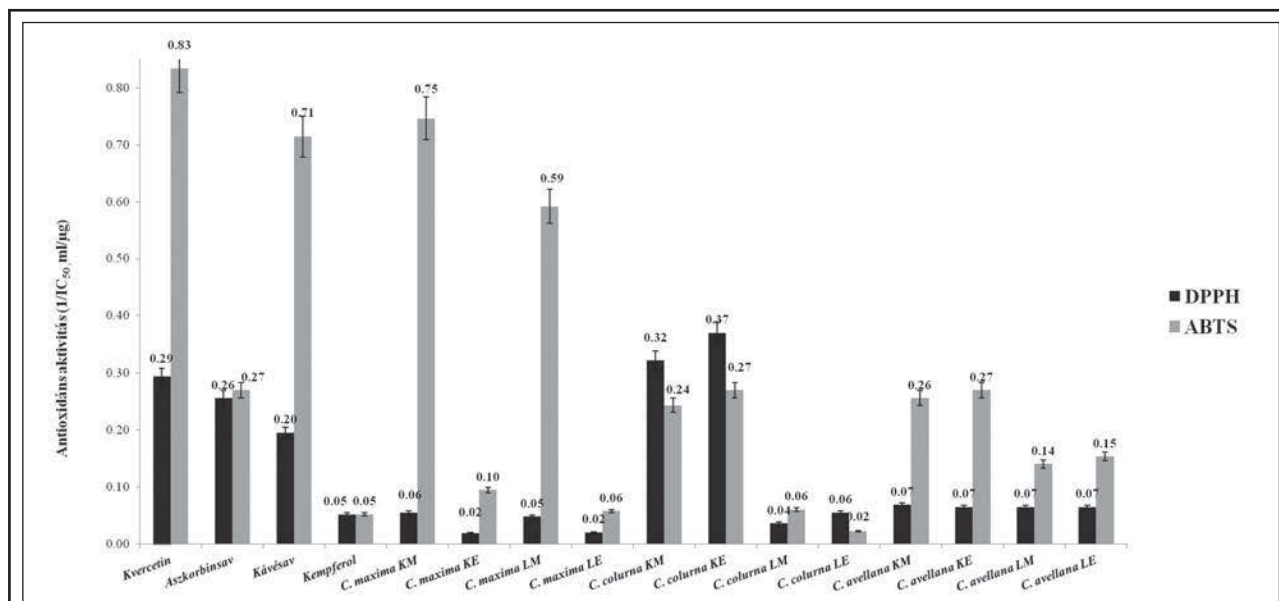
### Antioxidáns aktivitás vizsgálatok

A növényi eredetű polifenol vegyületek széles körben ismert antioxidánsok, melyek szemipoláros oldószerekkel, mint az etil-acetát, illetve a polárosabb metanol jó hatásfokkal vonhatók ki növényi drogokból. Ezekből kiindulva vizsgáltuk az etil-acetáttal és metanollal készült *Corylus* kivonatok szabadgyökfogó aktivitását DPPH és ABTS *in vitro* tesztekben. Eredményeink alapján (1. ábra) elmondható, hogy az általunk vizsgált extraktumok mindkét testben magas antioxidáns aktivitást mutattak (50  $\mu g/ml$ -nél alacsonyabb  $IC_{50}$  értékekkel).

A *C. maxima* levél és kéreg metanollal készült kivonatai kiemelkedően magas szabadgyökfogó kapacitással rendelkeztek az ABTS testben. A DPPH testben a *C. colurna* kéreg kivonatok mutatták a legmagasabb aktivitást, mely meghaladta a vizsgált referencia-vegyületekét is. A *C. avellana* kivonatok esetén nem mutatkozott szignifikáns különbség az egyes extraktumok DPPH-val szemben mutatott szabadgyökfogó aktivitásában, míg az ABTS testben a kéreg minták lényegesen aktívabbnak bizonyultak a levél kivonatoknál. Amint az az 1. ábrán is látható, egyértelmű trend nem olvasható ki eredményeinkből. Az összetett növényi kivonatok antioxidáns aktivitását a komponensek diverzitása mellett azok egymásra hatása is jelentősen befolyásolhatja. Minthogy a kivonatok mindkét *in vitro* testben magas szabadgyökfogó kapacitást mutattak, melynek hátterében a kivonó oldószerek polaritását figyelembe véve nagy valószínűséggel azok fenoloid komponensei állnak, az extraktumok fenoloid-profiljának jellemzése mindenképpen indokolt.

### A vizsgált *Corylus* kivonatok fenoloid-profiljának jellemzése

A *Corylus* extraktumokban detektált fenoloid komponensek kromatográfiás elválasztását két különböző módszerrel valósítottuk meg. A HPLC-DAD-ESI-QMS analízis során lassú (70 perc) gradienst alkalmaztunk az optimális felbontás elérése érde-



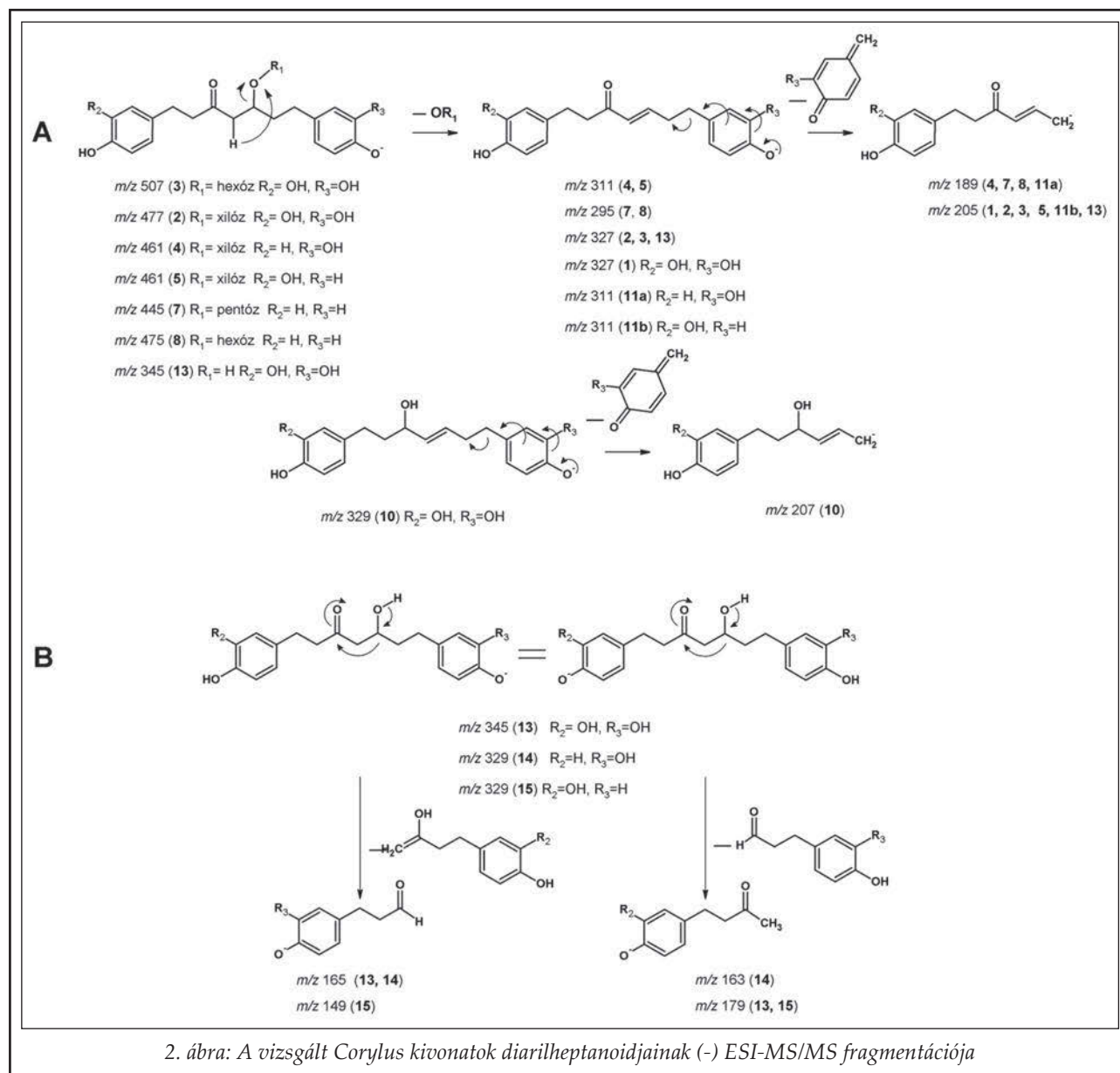
1. ábra: A vizsgált *Corylus* kivonatok és a referencia-vegyületek antioxidáns aktivitása ( $1/IC_{50}$ , ml/ $\mu g$ ) DPPH és ABTS *in vitro* tesztrendszerekben.

KM: kéreg metanolos kivonat, KE: kéreg etil-acetátos kivonat, LM: levél metanolos kivonat, LE: levél etil-acetátos kivonat.

kében, míg a HPLC-DAD-TOF-MS és HPLC-DAD-QqQMS vizsgálatok során, ahol a komponensek szerkezetének feltárása volt az elsődleges cél rövidebb analízis idővel (23 perc) dolgoztunk. A vegyületek szerkezetének jellemzéséhez a HPLC-DAD vizsgálatok során detektált UV spektrumukat, az HPLC-ESI-TOF analízisek eredményeként kapott pontos tömegüket és az ebből számolt összegképletüket, valamint HPLC-ESI-MS/MS fragmentációs mintázatukat vetettük össze referencia-vegyületekével, illetve ezek hiányában irodalmi adatokkal. [7-10]. Azon vegyületeknél, ahol rendelkezésre állt autentikus standard, melyek a hirsutenon (1), az oregonin (2), a miricetin-3-O-ramnozid (21), a kvercetin-3-O-ramnozid (23), a kemferol (26) és a rozmaringsav (35) voltak, az azonosítást a kivonatok

adott standarddal történő együtt kromatografálásával végeztük. A további vegyületek szerkezetét a fent említett UV-, valamint tömegspektrometriás módszerekkel, a referencia-vegyületek spektrális tulajdonságait és irodalmi adatokat alapul véve feltelesen azonosítottuk.

Összesen 37 különböző fenoloid komponenst detektáltunk a mogyoró kivonatokban, köztük húsz diarilheptanoidot (1-20), kilenc flavonol-származékot (21-29), valamint nyolc egyéb polifenol komponenst, kávésav-, kinasav-származékokat, illetve flavanonokat (30-37) (1. táblázat) [11-13]. A *C. avellana* levelében a szakirodalom beszámol flavonol-3-O-glikozidok (miricetin-3-O-ramnozid, kvercetin-3-O-ramnozid, kemferol-3-O-ramnozid) valamint hidroxifahéjsav-származékok



(1-kaffeoilkínasav, 1,3-dikaffeoilkínasav, kaffeoilborkósav valamint *p*-kumaroilborkósav) jelenlétéről [3], diarilheptanoid komponenseket *Corylus* fajban azonban ezidáig nem írtak le. Elsőként igazoltuk tehát a mogyoró nemzetség e három fájában diarilheptanoidok jelenlétét, emellett elsőként jellemeztük a *C. colurna* és *C. maxima* fenoloid-összetételét.

*A vizsgált Corylus kivonatok diarilheptanoidjainak azonosítása*

A 250-260 és 300-310 nm-en elnyelési maximummal rendelkező UV-spektrumok a jellegzetes (-) ESI-MS/MS fragmentációs mintázatokkal együtt húsz komponens (1-20) esetén utaltak diarilheptanoid szerkezetre. A HPLC-ESI-TOF analízisek eredményeképp kapott pontos tömegeket és összegképleteket, valamint az (-) ESI-MS/MS vizsgálatok során ütközésindukált disszociációval (collision induced dissociation, CID) előállított tömegspektrumokat autentikus standardokhoz és irodalmi adatokhoz hasonlítva [8] tizenöt diarilheptán szerkezete volt meghatározható. Bár a 16-20 számmal jelzett komponensek esetén az UV-spektrumok és összegképletek is diarilheptán szerkezetre utaltak, az (-) ESI-MS/MS fragmentáció alapján ezekről nem nyertünk pontosabb szerkezeti információt. A fent említett tizenöt azonosított diarilheptanoid komponens közül a hirsutenon (1) és oregonin (2) referencia-vegyület segítségével pontosan azonosítható volt. A további komponensek szerkezetét (-) ESI-MS/MS spektrumuk, összegképletük, retenció idejük a hirsutenon (1) és oregonin (2) standardek, illetve egymás vonatkozó adataival történő összevetése alapján feltételeesen azonosítottuk. Általánosságban elmondható, hogy a kivonatok diarilheptanoidjainak fragmentációja két különböző sémát követ (A és B, lásd 2. ábra). A 1-12 komponensek esetén az ütközésindukált disszociáció azonos trendje volt megfigyelhető (A), míg a 13-15 komponensek, ahol egy szubsztituálatlan hidroxil- és egy keto-csoport jelenlétét feltételeztük az alkil-lánc C5, illetve C3 pozíciójában, eltérő fragmentációs viselkedést mutattak (B).

A komponensek azonosításához a hirsutenon (1) aglikon és a hirsutanolol xilozid származéka, az oregonin (2) ütközésindukált disszociációja során bekövetkező fragmentációs folyamatok szolgáltattak támpontot. A hirsutenon (1) tömegspektrumában az  $m/z$  327,1228  $[M-H]^-$  molekulaion mellett a 205-ös  $m/z$  értéknél detektálható bázison

volt karakterisztikus. Az oregonin esetén az  $m/z$   $[M-H]^-$  477,1779 molekulaionból 150 amu semleges tömegvesztéssel képződő  $m/z$  327 aglikon-anion jelenléte a xilóz egység lehasadását jelzi.

Szintén 150 amu neutrális veszteséget detektáltunk, a 4, 5 és 7 számokkal jelzett komponensek esetén, így arra következtettünk, hogy ezek szintén pentóz-származékok. A 4 és 5 komponensek összegképlete ( $C_{24}H_{30}O_9$ ) az oregoninétól ( $C_{24}H_{30}O_{10}$ ) egy oxigén atomban különbözött, emellett az aglikon-anion ( $m/z$  311) relatív tömegében 16 Da eltérés volt detektálható az oregonin aglikon-anionjához ( $m/z$  327) képest. Ezekből arra következtethettünk, hogy a benzil-gyűrűk egyikén csak egy fenolos hidroxil-szubsztituens van jelen, míg a  $m/z$  205 és 189 fragmensionok jelenléte a komponensek tömegspektrumában két struktúrizomer (1-(4-hidroxifenil)-7-(3,4-dihidroxifenil)-heptán-3-on-5-O-pentozid (4) és 1-(3,4-dihidroxifenil)-7-(4-hidroxifenil)-heptán-3-on-5-O-pentozid (5)) koelúciójára utalhat (2. ábra).

A 7-es számmal jelzett komponens összegképlete ( $C_{24}H_{30}O_8$ ) két oxigén atommal tért el az oregoninétól ( $C_{24}H_{30}O_{10}$ ). Az aglikon-anion relatív tömege ( $m/z$  295) 32 Da-nal, míg másik karakterisztikus fragmensionjái ( $m/z$  189) 16 Da-nal különbözött a hirsutenon aglikon molekulaionjának ( $m/z$  327), illetve fragmensionjának ( $m/z$  205) vonatkozó értékeitől. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a komponens mindkét benzil-gyűrűjén csak egy-egy fenolos hidroxil-szubsztituens található, így a vegyület platifillonol-pentozidként (7) feltételeesen azonosítható.

Ahogy az oregonin (2) fragmentációja során a 150 amu semleges tömegvesztés pentóz, úgy a 3, 6, és 8-as számmal jelzett komponensek estében a 180 amu neutrális tömegvesztés hexóz egység lehasadására utalt. A hirsutanolol-hexozid (3) ( $[M-H]^-$  molekulaion  $m/z$  507,1855) azonosítását emellett aglikon-anionja ( $m/z$  327), valamint tömegspektrumának másik karakterisztikus fragmensionja ( $m/z$  205) tette lehetővé. Az 5-hidroxil-1,7-bisz-(4-hidroxifenil)-6-heptán-3-on-hexozid (6) UV- és tömegspektrumai is diarilheptanoid szerkezetre utaltak, a vegyületet aglikon formában is detektáltuk (12). A platifillonol-hexozid (8) tömegspektrumában a platifillonol-pentozid (7) esetén már ismertett karakterisztikus fragmensionok ( $m/z$  295 és 189) voltak jelen.

A diarilheptanoid-glikozidok mellett számos vegyületet mutattunk ki aglikon formában a kivonatokban (9-15). A 9-es számmal jelzett komponens molekulaionját  $[M-H]^-$   $m/z$  331,1545 értéknél,



míg a **10**-es komponensét  $m/z$  329,1383 értékeknél detektáltuk. Előbbi (**9**) molekulaionjának relatív tömegében ( $m/z$  331) 4 Da különbség volt megfigyelhető a hirsutenon (**1**) aglikonéhoz képest ( $m/z$  327), feltételezett összegképletük ( $C_{19}H_{24}O_5$  és  $C_{19}H_{20}O_5$ ) négy hidrogén atomban különbözött. Ezeket a tényeket és a tömegspektrumokat alapul véve a komponens feltételelesen 3-hidroxi-1,7-bisz-(3,4-dihidroxifenil)-heptánként (**9**) azonosítottuk. A **9** és **10** komponensek relatív tömege ( $m/z$  331 és  $m/z$  329), és összegképlete ( $C_{19}H_{24}O_5$  és  $C_{19}H_{22}O_5$ ) egyaránt két hidrogénatom különbségre utalt a vegyületek szerkezetében, melyből egy kettős kötés jelenlétére következtethettünk a **10**-es komponens alkil láncában. Ezt a feltételezést alátámasztja az is, hogy a komponens tömegspektrumának bázisionja ( $m/z$  207) szintén 2 Da különbséget mutat a hirsutenon karakterisztikus fragmensionjához ( $m/z$  205) képest. Feltételeztük ezért, hogy az alkil-lánc C3 pozíciójában hidroxil-szubsztituens, valamint a láncban valamely más helyzetben kettős kötés található, így a vegyületet 3-hidroxi-1,7-bisz-(3,4-dihidroxifenil)-heptánként jellemeztük (**10**). Meg kell jegyezni, hogy a tömegspektrumok alapján az 1,7-bisz-(3,4-dihidroxifenil)-heptán-3-on szerkezet sem zárható ki a **10**-es komponens esetén, de így az alkalmazott kromatográfiai rendszerekben a koelúció a **9**-es komponenssel nem lenne valószínű.

A **11**-es számmal jelzett komponens molekulaionját  $[M-H]^+$ , valamint karakterisztikus fragmensionjait  $m/z$  311,1283, illetve  $m/z$  205 és 189 értékeknél detektáltuk. A HPLC-ESI-TOF analízis eredményeképp a  $C_{19}H_{20}O_4$  összegképletet kaptuk, ami a hirsutenonétól ( $C_{19}H_{20}O_5$ ) mindössze egy oxigén atomban különbözik. A komponens tömegspektrumából arra következtethettünk, hogy a benzil-gyűrűk egyikén csak egy hidroxil-szubsztituens van jelen. A  $m/z$  205 és 189 értékeknél detektált fragmensionok különböző semleges veszteségek eredményeképp keletkezettek, melynek magyarázata, hogy mindkét fenil-gyűrű képes deprotonálódni és megtartani a negatív töltést (lásd **2. ábra**). Meg kell azonban jegyezni, hogy a tömegspektrum alapján két struktúrizomer: 1-(4-hidroxifenil)-7-(3,4-dihidroxifenil)-hept-4-én-3-on (**11a**) és 1-(3,4-dihidroxifenil)-7-(4-hidroxifenil)-hept-4-én-3-on (**11b**) koelúciója sem zárható ki.

A hirsutanolol (**13**) molekulaionját  $m/z$  345,1327 értéknél detektáltuk. A HPLC-ESI-TOF analízis a  $C_{19}H_{22}O_6$  összegképletre utalt, ami két hidrogén és egy oxigén atom különbséget mutat a hirsutenon-

néhoz képest. A karakterisztikus fragmensionok ( $m/z$  205, 179 és 165) alapján arra következtettünk, hogy az alkil-lánc C5 pozíciójában hidroxil-, míg a C3 helyzetben keto-csoport található. A  $m/z$  205 fragmension jelenléte arra utal, hogy a fragmentáció az **A** séma szerint ment végbe, míg a  $m/z$  179 and 165 értékű ionok a **B** séma szerinti ütközésindukált disszociációt támasztják alá, melynek során az említett ionok McLafferty átrendeződést követő semleges tömegvesztéssel keletkeznek (**2. ábra**). Utóbbi jelenség a **14** és **15** számmal jelzett komponensek esetén is megfigyelhető volt: 5-hidroxi-1-(4-hidroxifenil)-7-(3,4-dihidroxifenil)-heptán-3-on (**14**) és 5-hidroxi-1-(3,4-dihidroxifenil)-7-(4-hidroxifenil)-heptán-3-on (**15**).

*A vizsgált Corylus kivonatok flavonoidjainak és hidroxifahéjsav-származékainak azonosítása*

Az alkalmazott HPLC-ESI-MS/MS módszer ugyan nem alkalmas a flavonoid-glikozidok (**21-29**) szerkezetének pontos azonosítására, de releváns információt szolgáltat az aglikonok szerkezetéről, valamint a cukor szubsztituensek minőségéről és pozíciójáról [7]. A glikozid ütközésindukálta disszociációját követően detektálható fragmensionokat, azok relatív intenzitását a referencia-vegyületek tömegspektrumával összevetve az aglikon szerkezetek jó pontossággal azonosíthatók. A 146 amu semleges tömegvesztés dezoxihexóz lehasadására utal, a 162 amu hexóz szubsztituensre, míg a 176 amu neutrális tömegvesztés glukuronid egység jelenlétére enged következtetni. Irodalmi források alapján [7] a cukorkomponensek homolitikus hasadásakor keletkező gyökös aglikon-anion  $[Y_0-H]^+$  és a heterolitikus hasadásakor létrejövő nem gyökös aglikon-anion  $[Y_0]$  relatív intenzitásának arányából a glikozid egység kapcsolódási pozíciójára következtethetünk. Ezzel a módszerrel két miricetin-glikozidot: a miricetin-3-O-ramnozidot (**21**) és miricetin-3-O-hexozidot (**22**), három kvercetin-származékot: a kvercetin-3-O-ramnozidot (**23**), kvercetin-3-O-hexozidot (**24**), és a kvercetin-3-O-glukuronidot (**25**), valamint a kempferol aglikont (**26**) és három glikozidját: a kempferol-3-O-ramnozidot (**27**), egy kempferol-di(dezoxihexozid)-ot (**28**) és a kempferol-3-O-glukuronidot (**29**) azonosítottuk a mogyoró kivonatokban.

A hidroxifahéjsav-származékok (**30-37**), valamint flavanonok feltételes azonosítását azok tömegspektrumának szakirodalmi adatokkal [13], valamint referencia-vegyületekkel történő összehasonlításával végeztük.

*A Corylus kivonatok fenoloid-profiljának  
összehasonlítása*

HPLC-DAD (254, 290 és 340 nm) analíziseink eredményei alapján elmondható, hogy minden vizsgált mogyoró kivonat főkomponense flavonoid-származék volt (3. ábra). Kivételt képez a *C. avellana* kéreg metanollal készült extraktuma, melyben főkomponensként egy kávésav-származékot (30) azonosítottunk. A HPLC kromatogramok alapján *C. avellana* levél etil-acetáttal és metanollal készült kivonatában is a miricetin-3-*O*-ramnozid (21) volt jelen a legnagyobb mennyiségben, míg a kéreg etil-acetátos kivonatára a kvercetin- (23) és kempferol-3-*O*-ramnozidok (27) dominanciája volt jellemző. A *C. colurna* minták mindegyikének a kvercetin-3-*O*-ramnozid (23), míg a *C. maxima* kivonatoknak a miricetin-3-*O*-ramnozid (21) volt a főkomponense. Elmondható továbbá, hogy a miricetin- kvercetin- és kempferol-3-*O*-ramnozid mind a három mogyorófaj összes kivonatban detektálható volt.

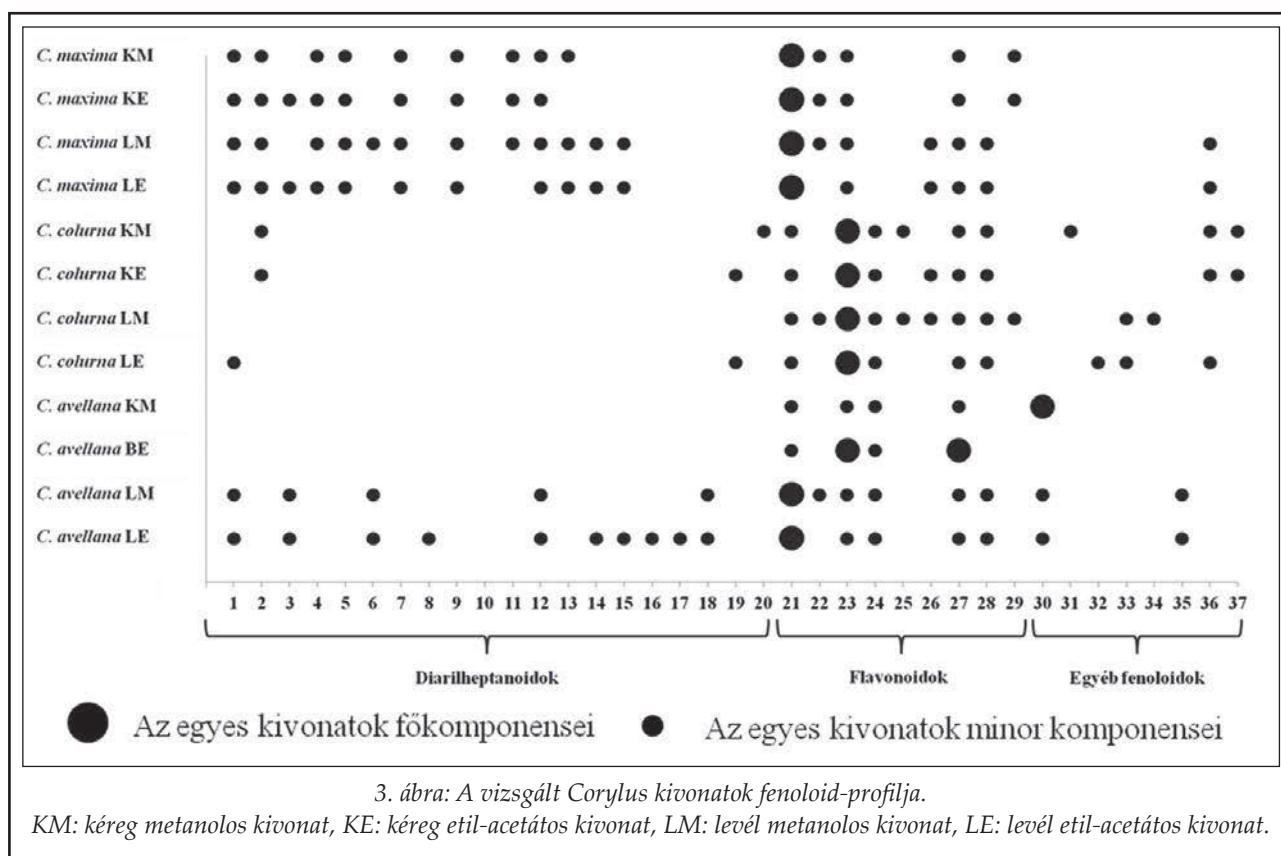
Mint az a 3. ábrát nézve is szembetűnő, a detektált diarilheptanoidok szerkezeti változatosságát tekintve a *C. maxima* kivonatok kiemelkedőnek bizonyultak. Mind a kéreg, mind a levél extraktumokban e vegyületek széles skálája volt kimutat-

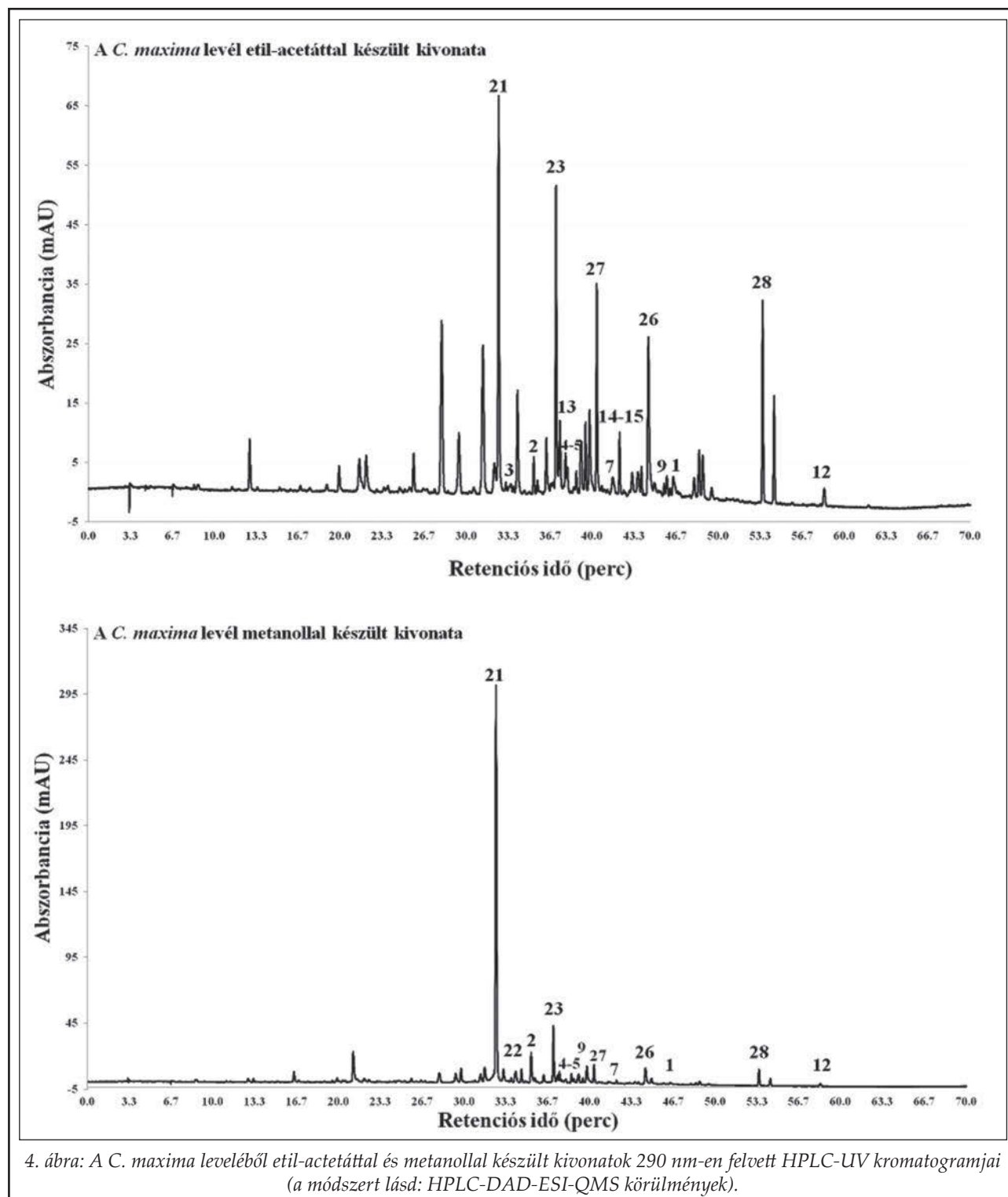
ható (1-7, 9, 11-15). A *C. avellana* levelében szintén számos diarilheptanoid komponens azonosítottunk (1, 3, 6, 8, 12, 14-18), a növény kérgében azonban ezek nem voltak detektálhatók. A *C. colurna* minták csak kis számban tartalmaztak diarilheptanoidokat (1, 2, 19, 20).

Elmondható továbbá, hogy a HPLC-DAD vizsgálatok eredményei alapján az etil-acetáttal készült extraktumok lényegesen komponensgazdagabbnak bizonyultak, a diarilheptanoid szerkezetű vegyületek kivonása ilyen körülmények között nagyobb hatásfokkal valósítható meg. Ennek illusztrálásaként mutatjuk be a 4. ábrán a *C. maxima* leveléből etil-acetáttal és metanollal készült kivonatok 290 nm-en felvett HPLC-UV kromatogramjait.

Meg kell jegyezni, hogy bár a növéyminták begyűjtése az évnek ugyanabban a szakában, a növények virágzás utáni állapotában történt, viszont az egyes fajok esetén egymást követő években, valamint különböző gyűjtési területeken. Ezek pedig kis mértékben, de befolyással lehetnek az egyes szekunder metabolitok mennyiségére és arányára.

Eredményeink alátámasztják a feltételezést, miszerint a kivonatok magas antioxidáns aktivitásáért azok fenoloid komponensei felelősek. A vizsgált extraktumok esetében a flavonol-glikozidok dominanciája volt jellemző, az egyéb fenoloidok,





köztük a diarilheptanoidok minor komponensként voltak detektálhatók. A szakirodalom mindkét vegyületcsoport esetén kiemelkedő antioxidáns aktivitásról számol be, így joggal feltételezhető, hogy a major komponens flavonoidok szabadgyökfogó kapacitását a kivonatokban jelen lévő diarilheptanoidok befolyásolják. Annak tiszt-

tázása, hogy ez a kölcsönhatás milyen természetű (szinergista, antagonistá, additív) további vizsgálatokat igényel.

### Összefoglalás

Eredményeink összefoglalásaként elmondható, hogy

HPLC-DAD-ESI-MS módszerekkel jellemeztük a három Kárpát-medencében honosogyoró faj, a közönségesogyoró, a törökogyoró és a csövesogyoró levél- és kéregdrogjaiból etil-acetáttal, valamint metanollal készült kivonatok fenoloid-profilját. Elsőként írtunk le a *Corylus* fajokban diarilheptanoid szerkezetű vegyületeket, emellett elsőként vizsgáltuk a török és csövesogyoró fenoloid-összetételét, melynek során az említett húsz diarilheptán mellett kilenc flavonol-glikozidot és nyolc egyéb fenoloidot azonosítottunk. Mindhárom vizsgáltogyorófaj drogjai tartalmaztak miricetin-3-O-ramnozid, kvercetin-3-O-ramnozid és kempferol-3-O-ramnozid flavonoidokat, fajtól és drogtól függően eltérő arányban. A detektált diarilheptanoid komponensek szerkezeti variabilitását tekintve a csövesogyoró drogok bizonyultak kiemelkedőnek. Eredményeink mind farmakognóziai és fitoterápiás, mind kemotaxonómiai szempontból is értékesek, emellett további vizsgálatok kiindulópontjául szolgálhatnak.

#### IRODALOM

1. Fu, S., Arráez-Roman, D., Segura-Carretero, A.: *Anal Bioanal Chem* 397, 643–654 (2010).
2. Novaković, M., Stanković, M., Vučković, I., Todorović, N., Trifunović, S., Tešević, V., Vajs, V., Milosavljević, S.: *Planta Med* 79, 499–505 (2013).
3. Amaral, J.S., Valentao, P., Andrade, P.B., Martins, R.C., Seabra, R.M.: *Sci Hort* 126, 306–313 (2010).
4. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.: *Free Radic Biol Med*, 26, 1231–1237 (1999).
5. Arts, M.J., Haenen, G.R., Voss, H.P., Bast, A.: *Food Chem Toxicol*, 42, 45–49 (2004).
6. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Bereset, C.: *Lebensm Wiss Technol*, 28, 25–30 (1995).
7. Ablajan, K., Abliz, Z., Shang, X.Y., He, J.M., Zhang, R.P., Shi, J.G.: *J Mass Spectrom* 46, 352–360 (2006).
8. Jiang, H., Timmermann, B.N., Gang, D.R.: *J Chrom A* 1111, 21–31 (2006).
9. Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H., Clayes, M.: *Rapid Commun Mass Sp* 11, 1357–1364 (1997).
10. Nandutu, A.M., Clifford, M., Howell, N.K.: *Afr J Biochem Res*, 1, 29–36 (2007).
11. Riethmüller, E., Alberti, A., Tóth, G., Béni, Sz., Ortolano, F., Kéry, Á.: *Phytochem Anal* 24, 493–503 (2013).
12. Riethmüller, E., Tóth, G., Alberti, Á., Sonati, M., Kéry, Á.: *Nat Prod Commun* 9, 679–682 (2014).
13. Riethmüller, E., Tóth, G., Alberti, Á., Végh, K., Burlini, I., Könczöl, Á., Balogh, Gy. T., Kéry, Á.: *J Pharm Biomed Anal* 107, 159–167 (2015).

Érkezett: 2015. február 6.





## Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

### Közlésre elfogadunk:

1. *Összegző közleményeket*, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. *Közleményeket*, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. *Rövid közleményeket*, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. *Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét*, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Feleslegesen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

### A kézirat elkészítésének módja:

#### a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

A hivatkozások módja:

Folyóiratcikk:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: *J. Pharm. Sci.* 86, 631-634 (1997)

Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rácz I., Plachy J., Csontos A.: *A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei.* Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): *Chiral Separations by HPLC.* Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31–68.

Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences. *Eur. J. Pharm. Sci.* 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint:

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásgátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdély-Grúz T. és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972.; F. Csányi P., Fábíán P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982.; valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szervetlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadóak.

#### b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A *dolgozat címe* (esetleg alcíme).

A *szerző(k) teljes neve* (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) *munkahelye* teljes postai címmel, valamint a *levelező szerző e-mail címe*.

A *dolgozat magyar nyelvű összefoglalása*.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

**Kulcsszavak:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó megadása.

A dolgozat *címe angol nyelven*, a szerző(k) neve (keresztnevek rövidítve).

**Angol nyelvű összefoglalás.**

**Bevezetés**, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

**Key-words:** A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcsszó angol nyelvű fordítása.

**Kísérleti rész**, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

**Eredmények.**

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

**Az eredmények értékelése.**

**Ábracímek.**

**Következtetések.** Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges **köszönetnyilvánítások.**

**Irodalomjegyzék.**



